Aus dem Institut für Physiologische Chemie II

der Universität Düsseldorf

Direktor : Professor Dr . W . Staib

DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HOCHGEREINIGTEM MYOSIN AUS DER SKELETMUSKULATUR DER RATTE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom - Biologe
Wolfgang Schaefer

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0094

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II

der Universität Düsseldorf

Direktor : Professor Dr . W . Staib

DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HOCHGEREINIGTEM MYOSIN AUS DER SKELETMUSKULATUR DER RATTE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom - Biologe
Wolfgang Schaefer

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Brüster

Referent:
gez.: Prof. Dr. Staib

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Reinauer

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	1o
2.1.	Material	1o
2.1.1.	Reagentien	1o
2.1.2.	Geräte	1o
2.1.3.	Versuchstiere	11
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Gewinnung von Rohmyosin	11
2.2.1.1.	Erstes Präparationsverfahren	11
2.2.1.2.	Zweites Präparationsverfahren	13
2.2.2.	Ammoniumsulfatfällung	15
2.2.3.	Ionenaustauschchromatographie	16
2.2.3.1.	DEAE-Sephadex A-5o	16
2.2.3.2.	DEAE-Sepharose CL-6B	16
2.2.4.	Chromatographie an Hydroxylapatit	17
2.2.5.	Gelchromatographie an Sephadex G-1o	17
2.2.6.	Proteinbestimmung	18
2.2.6.1.	Optische Methode nach Kalckar	18
2.2.6.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	18
2.2.6.3.	Mikro-Biuret-Methode	19
2.2.7.	Aktivitätsbestimmung der Ca^{++}- abhängigen Myosin-ATPase	19
2.2.8.	Phosphatbestimmung	2o
2.2.8.1.	Phosphatbestimmung nach Pollard	2o
2.2.8.2.	Phosphatbestimmung nach Lin und Morales	21
2.2.9.	Natriumdodecylsulfat-Elektrophoresen	22
2.2.1o.	Immunisierungsverfahren nach Gröschelt-Stewart	26
2.2.11.	Gewinnung von nativen Antikörpern und Anreicherung der Immunglobuline durch Ammoniumsulfatfällung	27

Seite

2.2.12. Ouchterlony-Diffusions-Methode 27
2.2.13. Jodierung von Myosin nach Bolton und Hunter 29

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION 3o
3.1. Natriumdodecylsulfat-Elektrophorese der myofibrillären Proteine 3o
3.2. Isolierung von Myosin 34
3.2.1. Gewinnung von Rohmyosin 34
3.2.1.1. Vergleich der beiden Präparationsverfahren 36
3.2.1.2. Verlaufskontrolle bei der Gewinnung von Rohmyosin nach dem zweiten Verfahren anhand von SDS-Elektrophoresen 39
3.2.2. Chromatographie-Verfahren zur Reinigung des Rohmyosins 41
3.2.2.1. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-5o 43
3.2.2.2. Chromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B 46
3.2.2.3. Chromatographie der DEAE-Sepharose CL-6B-Fraktionen an Hydroxylapatit 48
3.3. Biochemische Charakterisierung des hochgereinigten Myosins 51
3.3.1. Bestimmung der Michaeliskonstante der Ca^{++} -aktivierten Myosin-ATPase 51
3.3.2. Ca^{++} - Ionen als Aktivatoren der Myosin-ATPase 54
3.3.3. Hemmung der Myosin-ATPase durch Mg^{++} - Ionen 55
3.3.4. Einfluß der Temperatur auf die Myosin-ATPase 57
3.3.4.1. Temperatur - Optimum 57
3.3.4.2. Arrhenius - Diagramm 58
3.4. Darstellung der gegen Myosin gerichteten Antikörper 59
3.4.1. Ouchterlony - Diffusions-Test 59

		Seite
3.4.2.	Hemmung der Myosin-ATPase-Aktivität durch Antikörper gegen Myosin	60
3.5.	Trennung des ^{125}J-Myosin von niedermolekularen Reaktionsprodukten	62
4.	ZUSAMMENFASSUNG	64
5.	LITERATURVERZEICHNIS	67

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Körper der Säugetiere unterscheidet man drei Arten von Muskelgewebe:

a) Die Skeletmuskulatur, die mengenmäßig am meisten vertreten ist und willkürlich innerviert wird

b) die Herzmuskulatur, die vegetativ innerviert wird

c) Die glatte Muskulatur, die sich in den Wänden der Hohlorgane befindet und vegetativ innerviert wird

Die Zellen der Skelet- und der Herzmuskulatur weisen im lichtmikroskopischen Bild ein Querstreifung auf und werden daher als quergestreifte Muskulatur zusammengefaßt. Weiterhin besteht das quergestreifte Muskelgewebe, im Gegensatz zum glatten Muskelgewebe, nicht aus Einzelzellen, sondern stellt ein Plasmodium dar.

Aufbau des Skeletmuskels (siehe Abb. 1)

Der Skeletmuskel setzt sich aus Faserbündeln zusammen. Diese sind parallel zwischen den sehnigen Enden des Muskels angeordnet, so daß sich die Kontraktionskräfte der Einzelfasern addieren. Die Einzelfaser ist die kleinste morphologische Einheit des Skeletmuskels mit einer Länge von mehreren Zentimetern und einem Durchmesser von 10-100 µ. Die Fasern sind lange, mit Sarkoplasma gefüllte Zylinder, in welchen Hunderte bis Tausende von am Sarkolemm liegenden Kernen (ca. 20-40/mm Länge) vorkommen. Die Muskelfaser besteht aus Fibrillen, die faserförmig in Längsrichtung der Muskelzelle angeordnet sind. Die Myofibrillen zeigen ein Längsmuster, das sich etwa

alle 2.5 µm wiederholt. Diese sich wiederholenden Strukturen, die Sarkomere, stellen die kontraktilen Einheiten der Myofibrillen dar und enthalten in hoher Konzentration die Proteine Myosin und Actin.
Die typische Querstreifung ergibt sich aus der Anordnung der Sarkomere vieler parallel verlaufender Myofibrillen, wobei sich abwechselnd helle und dunkle Querbanden ergeben. Die hellen Banden werden als isotrope oder I-Banden und die dunklen Banden als anisotrope oder A-Banden bezeichnet. In der Mitte der I-Banden liegt eine dunkle Querlinie von ca. 80 nm Dicke, die sog. Z-Linie.
Der mittlere Teil der A-Bande ist weniger dicht und wird durch eine dicke Querlinie, die H-Bande unterteilt.
Das Sarkomer erstreckt sich zwischen zwei Z-Banden, wobei die Anordnung dicker und dünner Filamente die Grundlage der Streifung bildet.
Die dicken Filamente bestehen im wesentlichen aus Myosin, die dünnen aus Actin und Tropomyosin.
In der Mitte der A-Bande zeigt die hellere H-Bande den Bereich an, in dem, bei erschlafftem Muskel, Actin- und Myosinfilamente nicht mehr überlappen.
Die Z-Bande dient der Verankerung der Actinfilamente und enthält das Gerüstprotein α-Aktinin.
Ein weiteres Gerüstprotein, das M-Protein, das senkrecht zur Längsachse der Filamente steht, soll die dünnen Filamente, da diese nicht bis zur Mitte des Sarkomers reichen, verankern.

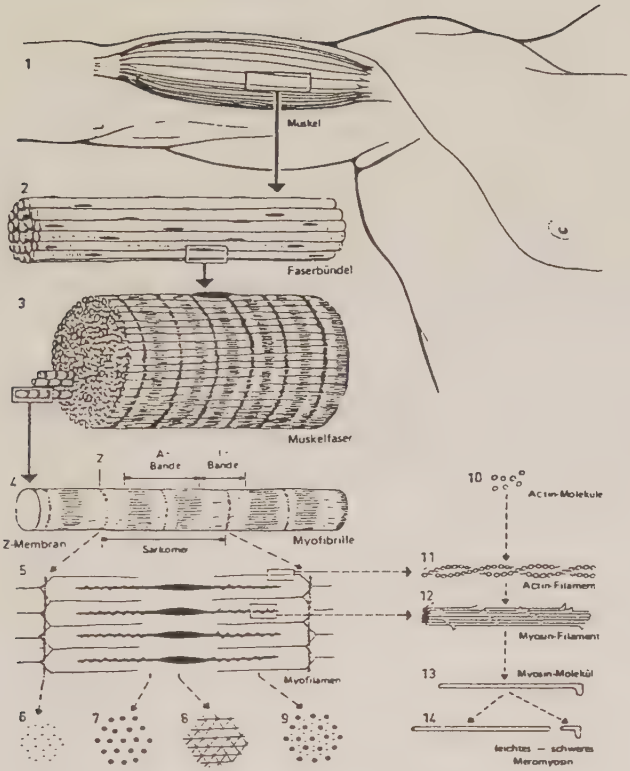


Abb. 1: Aufbau eines quergestreiften Muskels
Nach Harper et al (3).

1 = Muskel;
2 = Faserbündel
3 = Muskelfaser
4 = Myofibrille
5 = Aufbau des Sarkomers
6,7,8,9 = Querschnitte der Myofibrille in der angezeigten Schnitthöhe
10 = G-Actin-Moleküle
11 = Doppelstrang aus zu F-Actin polymerisierten G-Actin-Molekülen
12 = Dickes Filament, aus Myosinmolekülen bestehend
13 = Myosin-Molekül
14 = Myosin kann durch Proteasen in leichtes (Schwanz) und schweres (Kopf) Meromyosin gespalten werden.

Die Proteine der Muskelzellen (siehe Tab. 1)

Der Proteingehalt einer Muskelzelle besteht zu 2o-25% aus den wasserlöslichen Proteinen des Sarkoplasmas, der myogenen Fraktion, zum anderen aus den wasserunlöslichen Proteinen der Myofibrillen.
Die beiden Hauptkomponenten der wasserunlöslichen Proteine sind das Myosin und das Actin, die zusammen ca. 8o% des Gesamtproteins der Myofilamente ausmachen.
Daneben gibt es noch wenigstens sechs weitere Proteine; Tropomyosin, Troponin, C-Protein, M-Protein, α-Aktinin und β-Aktinin.
In Tabelle 1 wird in einer Übersicht der verschiedenen Proteine, deren Lokalisation, prozentualer Gewichtsanteil, Zahl der Untereinheiten und Funktion dargestellt.

Tab. 1: Proteinkomponenten der Myofilamente: Skeletmuskel des Kaninchens. Nach A. L. Lehninger (4)

Vorkommen	Gewichtsanteil(%) am Myofibrillengewicht	Untereinheiten	Funktion
Dicke Filamente			
Myosin	55-60	2 schwere Ketten 4 leichte Ketten	Brückenbildung mit Actin, ATPase-Aktivität, Kraftentwicklung
C-Protein	?	?	? Strukturprotein
M-Linien-Protein I	)		)
M-Linien-Protein II	) 0.5	?	) Strukturproteine)
Dünne Filamente			
F-Actin	20	$_n$G-Actin	Brückenbildung mit Myosin, Kraftentwicklung
Tropomyosin	4,5	2 Ketten	Regulation der Actin-Myosin-Wechselwirkung
Troponin	3-5	3 Untereinheiten	Regulation der Actin-Myosin-Wechselwirkung
α-Aktinin	2		Strukturprotein

Myosin

Myosin ist Hauptbestandteil der dicken Filamente und kann durch Lösungen hoher Salzkonzentration aus dem Muskel extrahiert werden.
Myosin wird zu den fibrillären Proteinen gerechnet. Es ist ein ca. 160 nm langes stabförmiges Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 470 000 (3,5,7).
Das Protein besteht aus zwei identischen Polypeptidketten (MG 200 000). Diese besitzen auf einer Strecke von ca. 130 nm eine rein α-helikale Sekundärstruktur und sind schraubenförmig umeinander gewickelt ("coiled-coil"-Struktur). Dieser Teil wird der Schaftteil des Myosins genannt. An einem Ende falten sich die Polypeptidketten zu globulären Strukturen auf. Diese beiden globulären Teile heißen die "Köpfchen" des Myosins.
Des weiteren sind bei der quergestreiften Muskulatur noch vier kleine Polypeptidketten (leichte Ketten) in nichtkovalenter Bindung an den globulären Teil des Myosins gelagert. Zwei der leichten Ketten sind identisch und haben ein Molekulargewicht von 18 000. Die beiden anderen Ketten weisen Molekulargewichte von 16 000, bzw. 21 000 auf. (Von den leichten Ketten sind zwei zur Entfaltung der Enzymaktivität notwendig).
Die schweren Ketten des Myosins sind die längsten einzelnen Polypeptidketten und enthalten jeweils etwa 1800 Aminosäurereste.
Das Myosin des Skeletmuskels enthält drei ungewöhnliche, methylierte Aminosäuren: 3-Methylhistidin, ε-N-Monomethyllysin und ε-N-Trimethyllysin, die im Kopfteil lokalisiert sind (4).

Weitere Charakteristika sind das starke Bindungsvermögen an F-Actin und die Tendenz, bei Salzkonzentrationen, wie sie in der Zelle vorkommen, mit sich selbst unter Ausbil-

dung filamentöser Aggregate zu assoziieren (5,7,8). Bei hohen Ionenstärken (I = o.3 M KCl) und neutralem pH tritt Myosin als Monomer auf. Erniedrigt man die Ionenstärke von o.3 M KCl auf o.1 M KCl, trübt sich die Lösung und in der analytischen Zentrifuge erscheint eine schnell sedimentierende Protein-Species. Wird die Ionenstärke noch weiter erniedrigt, tritt eine deutliche Präzipitation auf.

Bemerkenswert ist, daß Myosin, neben charakteristischen Eigenschaften als Strukturprotein, ATPase-Aktivität besitzt; alle anderen Proteine des kontraktilen Apparates sind enzymatisch inaktiv.

Die Frage nach der Lokalisation der enzymatischen Aktivität bzw. der Bindungsstellen für Actin konnte durch Fragmentierung mit proteolytischen Enzymen geklärt werden.

Trypsin in niedriger Konzentration spaltet Myosin in zwei Fragmente (9,1o, 11), LMM (Light Meromyosin) und HMM (Heavy Meromyosin).
LMM (MG ca. 15o ooo) behält die Fähigkeit zur Selbst-Assoziation und bildet bei niedriger Ionenstärke ($\leq$ o.1 M KCl) große geordnete Aggregate. LMM hat einen hohen α-helikalen Anteil (> 9o%), ist aber nicht in der Lage ATP zu hydrolysieren oder Actin zu binden.

Dagegen enthält HMM die beiden globulären "Köpfchen" und weist ATPase-Aktivität und Actin-Bindungsvermögen auf (12).
HMM hat die Fähigkeit zur Aggregatbildung verloren und bleibt selbst bei niedrigen Ionenstärken in Lösung.

Mit Papain, einem weiteren proteolytischen Enzym, kann HMM in drei weitere Fragmente aufgespalten werden (lo); in zwei Moleküle HMM-Subfragment-1 und einem Molekül HMM-Subfragment-2.
Beide Subfragmente sind wasserunlöslich, wobei die enzymatische Aktivität ausschließlich in Subfragment-1 lokalisiert ist.

Der molekulare Mechanismus der Kontraktion

Auf die Darstellung der elektrophysiologischen und biochemischen Modellvorstellungen des äußerst komplexen Kontraktionsablaufes kann im Rahmen dieser Arbeit nur kurz eingegangen werden:
Die Muskelverkürzung ergibt sich aus der Längenänderung der vielen Sarkomere (im menschlichen Bicepsmuskel ca. lo Billionen), die in der Myofibrille hintereinander geschaltet sind.
Bei der Verkürzung gleiten die dünnen Filamente aus Actin über die dicken Filamente aus Myosin.
Der Vorgang wird durch die Depolarisation der Muskelfasern und der damit verbundenen Freisetzung von Ca^{++}-Ionen aus den terminalen Zisternen ausgelöst.
Dabei wirkt das freigesetzte Ca^{++}-Ion über das Troponin-Tropomyosin-System als Derepressor, indem es über das Troponin den hemmenden Effekt, den das Tropomyosin ausübt, aufhebt.
Dadurch wird die Bindungsstelle für Myosin in den G-Actinmonomeren freigesetzt und geht mit dem energiereichen Myosinkopf unter ATP-Verbrauch eine Querbrückenverbindung ein.
Die Bildung und Lösung von Querbrücken und die damit verbundene Winkeländerung des Myosinkopfes im Gelenk ermöglicht letzten Endes das Darübergleiten von Actin über das Myosin.

Die Relaxation geschieht durch Entfernung der Ca^{++}-Ionen vom kontraktilen System in das sarkoplasmatische Reticulum.

Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung und Charakterisierung von Myosin aus der Skeletmuskulatur der Ratte und Einsatz des hochgereinigten Proteins als Antigen zur Gewinnung von Antikörpern aus Kaninchen.
Die Ergebnisse bilden die Grundlage zur Entwicklung eines Radioimmuno-Assay (RIA) zur quantitativen Erfassung von Myosin.
Die Spezifität eines RIA hängt u.a. von der Reinheit des Antigens ab, das zur Gewinnung von Antikörpern eingesetzt wird. Daher mußte ein Isolierungsverfahren zur Reinigung von Myosin gesucht werden, das großmögliche Reinheit aufwies.
In den, in der Literatur beschriebenen, üblichen Verfahren zur selektiven Anreicherung von Myosin (13,14, 15,16) konnten anhand der von Shapiro et al (17) eingeführten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese deutlich Kontaminationen an Proteinen der Myofibrille nachgewiesen werden, hauptsächlich M-Protein, C-Protein, α-Aktinin, aber auch Actin (18,19).
Bessere Verfahren der Reinigung von Myosin wurden von mehreren Autoren durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex (13,2o,21,22) und durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung (16) erreicht.
Da anfangs wenig Erfahrung im Umgang mit Muskelproteinen vorlag, wurde nach eingehenden Literaturstudien zunächst ein nach Richard et al (22) modifiziertes Isolierungsverfahren (Erstes Präparationsverfahren) erprobt und die dabei gewonnen Erfahrungen in einem eigenen Verfahren (Zweites Präparationsverfahren) umgesetzt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Reagentien

Alle hier nicht angeführten Substanzen waren analysenrein und stammten von der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Serva, Heidelberg:
Acrylamid, N,N-Bisacrylamid, Tetramethyläthylendiamin, 2-Mercapoäthanol, Äthylendiamintetraessigsäure. Na_2-Salz, Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N-tetraessigsäure, Dithioerythrit, Coomassie Brillant Blue G-25o und sämtliche als Eichsubstanzen verwendeten Proteine

Von Bio-Rad Laboratories GmbH, München:
Hydroxylapatit; Bio-Gel HT

Von Pharmacia, Uppsala, Schweden:
DEAE-Sephadex A-5o, DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-2oo, Sephadex G-1o

2.1.2. Geräte

Spektralphotometer Acta V, Firma Beckmann
Filterphotometer 11o1 M, Firma Eppendorf
LKB Ultraroc Fraktionssammler 7ooo
LKB Uvicord II Durchflußphotometer
Sorvall RC 2-B Kühlzentrifuge
Ultrazentrifuge Spinco L2 5o B, Firma Beckmann
Desaga Elektrophorese- und Gelgußapparatur
Desaga Netzanschlußgerät Modell 12126o
Braun Homogenisator, Typ MX 32

Omni-Mixer, Du Pont-Instruments
Ultra-Turrax, Janke & Kunkel KG
Auto-Gamma Scintillations-Spectrometer 5120,
Firma Packard

2.1.3. Versuchstiere

a) Albinoratten beiderlei Geschlechtes des Stammes Wistar II (Tierhaus Düsseldorf) zur Gewinnung von Skeletmuskulatur
b) Weiße Neufundländer zur Gewinnung von Antikörpern

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung von Rohmyosin

Vorbemerkungen:
Alle Präparationen wurden im Kühlraum bei Temperaturen um 4°C oder unter entsprechender Kühlung (Eisbäder, Kühlzentrifugen) durchgeführt. Als Antioxidans wurde fast allen Lösungen 2-Mercaptoäthanol (1 mM) oder Dithioerythrit (0.1 mM) zugegeben. Das zur Fällung verwendete dest. Wasser war auf ca. 4°C gekühlt und mit 1 mM EDTA sowie 1 mM 2-Mercaptoäthanol versehen.

2.2.1.1. Erstes Präparationsverfahren

a) Abtrennung der myogenen Fraktion und Darstellung von glycerinierten Myofibrillen:
Muskelgewebe wurde mit 5 Volumina Vorextraktions-Puffer (50 mM Imidazol-Puffer, pH 6.80, 1 mM Mercaptoäthanol und 1 mM EDTA) im Star-Mix (Fa. Braun) bei maximaler Drehzahl 3 min. zerkleinert.

Die Suspension wurde abzentrifugiert (1o min, GSA-Rotor, 1o ooo x g, O°C) und das Sediment noch 2 mal mit je 5 Volumina Puffer gewaschen. Zum Sediment wurde ein gleiches Volumen Glycerin gegeben, mit dem Ultraturrax in Suspension gebracht und bis zur weitern Verwendung bei -2o°C aufbewahrt.

b) Extraktion mit o.37 M KCl:
Die Myofibrillen wurden dann durch 3o-minütige Zentrifugation (GSA-Rotor, 1o ooo x g, O°C) vom Glycerin befreit, anschließend noch 2 mal mit Vorextraktions-Puffer gewaschen (3o min, GSA-Rotor, 1o ooo x g, O°C). Das Sediment wurde mit 4 Volumina Extraktions-Puffer (o.37 M KCl, 5o mM Histidin, 1o mM Natriumpyrophosphat und o.1 mM DTT) homogenisiert, 1o min gerührt und anschließend bei 9ooo x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand zur Fällung weiterverwendet.

c) Fällung durch Herabsetzen der Ionenstärke:
Der Überstand wurde mit 1o Volumina dest. Wasser gefällt, ca. 12 h stehengelassen und anschließend dekantiert. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert (1o min, GSA-Rotor, 1o ooo x g, O°C), der Überstand verworfen und das Sediment weiterverwendet.

d) Extraktion mit o.5 M KCl:
Das Sediment wurde mit 3-4 Volumina o.5 M KCl-Lösung (o.5 M KCl, 5o mM Tris/HCl, pH 7.6o, 1 mM EDTA, 6 mM $MgCl_2$ und o.1 mM DTT) homogenisiert.

e) Ultrazentrifugation nach Weber:
Mit 1o-fach konzentrierter neutraler ATP-Stammlösung wurde die Probe auf 4 mM ATP gebracht und die Lösung 9o min bei 1oo ooo x g zentrifugiert.

f) Dialyse und erneute Fällung:
Der Überstand wurde gegen Natriumpyrophosphat-Puffer (4o mM NaPP/HCl, pH 7.5o, 1 mM 2-Mercaptoäthanol) dialysiert, die Proteinlösung im Dialyseschlauch gegen Wasser gefällt und anschließend abzentrifugiert (1o min, 1o ooo x g, 0°C)

g) Ribonuklease-Behandlung und Dialyse gegen den Startpuffer der Säulenchromatographie:
Das Sediment wurde mit 2 Volumina NaPP-Puffer gelöst, die Probe mit Ribonuklease (5o µg/ml Probe) versetzt, 4 h bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend 12 h gegen NaPP-Puffer dialysiert. Als letztes wurde die Lösung 3o min bei 2o ooo x g zentrifugiert und der Überstand zur Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex A-5o verwendet.

2.2.1.2. Zweites Präparationsverfahren

Das 2. Verfahren entsprach weitgehend dem oben geschilderten, wurde aber in einigen wesentlichen Punkten modifiziert und erweitert:

a) Abtrennung der myogenen Fraktion und Gewinnung von Myofibrillen:
Muskelgewebe wurde mit 4 Volumina modifizierten Vorextraktionspuffer (5o mM Imidazol/HCl, pH 6.8o, o.1 mM EGTA, 1o mM NaPP, o.1 mM DTT und 5o mM KCl) zerkleinert. Die Probe wurde abzentrifugiert (1o min, GSA-Rotor, 1o ooo x g, 0°C) und noch 3 mal mit Puffer gewaschen.

b) Erste Extraktion:
Das Sediment wurde mit 3 Volumina Extraktionspuffer (o.37 M KCl, 5o mM Imidazol, 1o mM NaPP, o.1 mM DTT, pH 6.8o) homogenisiert.

Die Suspension wurde 15 min gerührt, anschließend abzentrifugiert (1o min, 1o ooo xg, 0°C) und der Überstand über Glaswolle filtriert.

c) Fällung durch Herabsetzen der Ionenstärke:
Das Filtrat wurde mit 1o Volumina dest. Wasser gefällt und über Nacht (ca. 12 h) stehengelassen.

d) Zweite Extraktion:
Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert (1o min, 1o ooo x g, 0°C) und das Sediment mit 3 Volumina o.5 M KCl-Lösung (o.5 M KCl, 5o mM Tris/HCl, pH 7.6o, 1 mM EDTA, 6 mM $MgCl_2$ und o.1 mM DTT) gelöst.

e) Ultrazentrifugation nach Weber:
Die Probe wurde mit konzentrierter und neutraler ATP-Lösung auf 4 mM ATP gebracht und anschließend 9o min bei 1oo ooo x g zentrifugiert.

f) Ammoniumsulfatfällungen:
Die oberen 2/3 des Überstandes der Ultrazentrifugation wurden durch Zugabe einer bei 0°C gesättigten, neutralen Ammoniumsulfatlösung (mit 2.5 M NH_4, neutralisiert, 1 mM EDTA enthaltend) auf 38% Sättigung gebracht.
Die Suspension wurde 3o min gerührt, anschließend abzentrifugiert (1o min, 1o ooo x g, 0°C) und der Überstand auf 5o% Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht.
Die Probe wurde 3o min lang gerührt, dann abzentrifugiert (1o min, 1o ooo x g, 0°C).

g) Dialyse gegen Startpuffer der DEAE CL-6B-Chromatographie:
Das Sediment wurde mit 1 Volumenteil 2-fach konzentriertem Startpuffer der Ionenaustauscher-Chromatographie gelöst und anschließend ausgiebig gegen den

Startpuffer (4o mM NaPP/HCl, pH 7.5o) dialysiert.

2.2.2. Ammoniumsulfatfällung (23)

Aus der Rohmyosin-Lösung wurde zunächst Actin durch eine 38% Ammoniumsulfatsättigung entfernt und das Myosin zwischen 38 und 5o% Sättigung ausgefällt.
Die jeweils benötigte Ammoniumsulfatmenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gramm } (NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77 \times V(S-s)}{3.54 - S}$$

V = Volumen der Lösung
S bzw. s = gewünschte bzw. vorliegende Ammoniumsulfat-Sättigung in Bruchteile von 1

Die benötigte Menge wurde fein zermahlen und unter vorsichtigem Rühren langsam (ca. 6g/min) in die mit Eiswasser gekühlte Lösung eingestreut.
Nach 3o-minütigem Rühren zur Einstellung des Sättigungsgleichgewichtes wurde die Lösung in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert.
Kleinere Mengen Proteinlösung (bis zu 5o ml) wurden mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (Sättigung bei 0°C, Neutralisation mit 2 N NH_3 und Zusatz von 1 mM EDTA) auf die entsprechende Sättigung gebracht.
Die benötigte Menge berechnet sich nach:

$$X = \frac{V(S-s)}{1-S}$$

X = benötigte Anzahl ml gesättigter Lösung

V = Volumen der Lösung

S bzw. s = gewünschte bzw. vorliegende Sättigung in Bruchteilen von 1

2.2.3. Ionenaustauschchromatographie (24)

2.2.3.1. DEAE-Sephadex A-5o (25)

Das Säulenmaterial wurde in Startpuffer (o.o4 M NaPP/HCl, pH 7.5o, 1 mM Mercaptoäthanol) aufgeschlämmt und zur Quellung 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Suspension wurde abgenutscht, erneut in NaPP-Puffer aufgenommen, unter Wasserstrahlvakuum entlüftet und in eine mit Glaswolle verschlossene Säule (2.5 x 45 cm) gegossen.
Die Packung der Säule wurde unter konstanten hydrostatischem Druck bis zu einer Füllhöhe von 38 cm durchgeführt. Die Äquilibrierung erfolgte im Kühlraum bei 4°C mit Startpuffer, bis gleicher pH und Ionenstärke in Start und Eluat erreicht waren (2-3 Säulenvolumina).

Rohmyosin-Proben wurden ausgiebig gegen Startpuffer äquilibriert, und auf die fast trockene Geloberfläche aufgetragen.
Nach ausgiebigem Waschen mit Startpuffer (bis zu 3.5 Säulenvolumina) wurde zur Elution des Myosins ein linearer KCl-Gradient mit je 2.7 Säulenvolumina pro Pufferkonzentration angelegt (4o mM NaPP-Puffer, pH 7.5o gegen 4o mM NaPP-Puffer, pH 7.5o, o.5 M KCl).

Mit dem LKB-Fraktionssammler wurden Fraktionen gesammelt, die UV-Absorption bei 28o und 26o nm ausgemessen, entsprechende Röhrchen vereinigt und gegebenenfalls mit N_2-Druck am Diaflofilter oder mit Puderzucker im Dialyseschlauch eingeengt.

2.2.3.2. DEAE-Sepharose CL-6B (25)

Vorbehandlung des Ionenaustauschers, Packen der Säule, Äquilibrierung und Elution erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie an DEAE-Sephadex A-5o.

2.2.4. Chromatographie an Hydroxylapatit (26)

Bio-Gel HT (Fa. Bio-Rad) wurde durch vorsichtiges Schwenken in Suspension gebracht und in einen Glaszylinder gegossen. Nach 3o-minütigem Absetzen des Geles wurde dekantiert, das Gel mit Startpuffer (o.16 M KH_2PO_4/KOH, pH 6.8o, o.4 M KCl, 1 mM Mercaptoäthanol) erneut in Suspension gebracht und für 15 min bei 8O°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden zur Entfernung der "fines" noch 2 zusätzliche Dekantierschritte durchgeführt. Dann wurde die verschlossene Säule (1.2 x 18 cm) halbvoll mit Startpuffer gefüllt und die benötigte Menge Suspension über einen Trichter mit großer Öffnung eingegossen.
Nach Stabilisierung des Bettvolumens (ca. 14 cm Füllhöhe) wurde die Säulenfüllung im Kühlraum bei 4°C mit 2 Volumina Startpuffer äquilibriert.
Die gegen Startpuffer erschöpfend dialysierte Proteinprobe wurde auf die fast trocken gelaufene Säule gegeben, mit wenig Puffer gewaschen und im Stufengradienten nach Mozersky et al (46) eluiert.

2.2.5. Gelchromatographie an Sephadex G-1o

Neues Sephadex G-1o wurde nach Vorschrift des Herstellers als wässrige Suspension auf dem kochenden Wasserbad gequollen. Anschließend wurde abgenutscht, das Gel in NaPP-Puffer (2o mM NaPP/HCl, pH 7.5o, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3) aufgenommen, unter Wasserstrahlvakuum entlüftet und in eine Säule (1.5 x 2o cm) eingeschlämmt.

Nach der Äquilibrierung mit 3 Volumina NaPP-Puffer bei 4°C wurde die Proteinlösung (ca. o.8 ml) auf die fast trocken gelaufene Säule gegeben, mit wenig Puffer gewaschen und anschließend in Fraktionen zu 3o Tropfen gesammelt.

2.2.6. Proteinbestimmung

2.2.6.1. Optische Methode nach Kalckar (23)

Es wurde die Absorption einer Proteinlösung gegen dest. Wasser bei 260 und 280 nm gemessen und der Proteingehalt nach der Formel von Kalckar berechnet:

$$mg\ Protein/ml = 1.45 \times E_{280} - 0.74 \times E_{260}$$

2.2.6.2. Proteinbestimmung modifiziert nach Lowry et al (27)

Lösungen:

Lsg. 1: 20 g Na_2CO_3 ad 1 Ltr. mit dest. Wasser; 10 ml 2.7% Kalium-Natrium-Tartratlsg. in dest. Wasser; 10 ml 1% $CuSO_4$ in dest. Wasser (wird in kleinen Portionen unter schnellem Rühren zugegeben)

Lsg. 2: Folin-Ciocalteu-Reagenz (Merck) mit dest. Wasser auf 1 N Säure eingestellt

Lsg. 3: 10% Trichloressigsäure (TCA) in dest. Wasser

Bestimmung des Proteingehaltes der myofibrillären Fraktionen:

100-500 µl Probelösung, die zwischen 30 und 500 µg Protein enthielt, wurde mit gleichem Volumen kalter 10% TCA gefällt, 2 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, das Sediment mit 1 ml kaltem dest. Wasser versetzt und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml 1 N NaOH (notfalls für 3 min im kochenden Wasserbad) gelöst. Davon wurden 500 µl in Reagenzgläser überführt und 500 µl dest. Wasser hinzugegeben. Dann wurden 5 ml Lsg. 1 hinzugefügt und kräftig geschüttelt. Nach 10 min erfolgte die Zugabe

von o.5 ml Lsg. 2.
Nach 6o min wurden die Proben in einer 1 cm-Küvette bei 578 nm gegen den Blindwert gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve mit kristallisiertem Rinderserumalbumin bestimmt.

2.2.6.3. Mikro-Biuret-Methode modifiziert nach Goa (28)

Biuret-Reagenz:
17.3 g Natriumcitrat und 1o g Natriumcarbonat wurden in ca. 5o ml dest. Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst. 1.73 g $CuSO_4$ x 5 H_2O wurden in 1o ml dest. Wasser gelöst, zur obigen Lösung gegeben und auf 1oo ml dest. Wasser aufgefüllt.

Durchführung:
Proben von o.1 - 3 mg Protein wurden, wie unter 2.2.6.2. beschrieben, behandelt, d.h. mit gleichem Vol. TCA gefällt, gewaschen und der Niederschlag in 1 ml o.5 M NaOH gelöst. Die Lsg. wurde mit 1oo µl Biuret-Reagenz versetzt und kräftig geschüttelt.
Nach 15 min wurden die Proben bei 33o oder 54o nm gegen den Blindwert gemessen.

Es wurden Eichkurven mit kristallisiertem Rinderserumalbumin bei 33o nm und 54o nm erstellt. Hieraus ergab sich für die jeweilige Wellenlänge folgende Berechnungsformel:

33o nm: mg Protein/ml = E_{33o} x 1.282

54o nm: mg Protein/ml = E_{54o} x 4.444

2.2.7. Aktivitätsbestimmung der Ca^{++} - abhängigen Myosin-ATPase (29)

Die Enzymbestimmung erfolgte diskontinuierlich in einem

1 ml Reaktionsansatz bei 25°C.

Lösungen:
Lsg. 1: ATPase-Puffer; 5o mM Tris/HCl, pH 7.5o, o.5 M KCl

Lsg. 2: 1o mM $CaCl_2$ in Lsg. 1

Lsg. 3: Myosin gegen Lsg. 1 dialysiert

Lsg. 4: 2o mM ATP(Na-Salz), in Lsg. 1 gelöst und mit o.1 M KOH auf pH 7.5 gebracht.

Durchführung:
o.7 ml ATPase-Puffer, o.1 ml $CaCl_2$-Lsg. und o.1 ml Proteinlsg. wurden im Thermostaten 3 min lang vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit o.1 ml ebenfalls vorinkubierter 2o mM ATP-Lsg. gestartet.
Zu geeigneten Zeiten wurden aus dem Ansatz Aliquote von o.1 - o.5 ml entnommen und freigesetztes anorganisches Phosphat (P_i) nach Pollard (29 oder Lin (3o) bestimmt.

2.2.8. Phosphatbestimmung

2.2.8.1. Phosphatbestimmung nach Pollard und Korn (29)

Lösungen:
Lsg. 1: 4% Wolframatokieselsäure in 3 N H_2SO_4

Lsg. 2: 2- Butanol/Benzol, 1:1

Lsg. 3: 1o% Ammoniummolybdat in dest. Wasser

Lsg. 4: 1o% $SnCl_2$ in 12 N HCl

Lsg. 5: o.73 N H_2SO_4 in Äthanol

Lsg. 6: wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt: 1 ml Lsg. 4 wird mit 25 ml 1 N H_2SO_4 verdünnt

Durchführung:
Aus der ATPase-Nachweisreaktion wurde zu geeigneten Zeiten ein Aliquot (a) von o.1 - o.5 ml in ein Zentrifugenglas überführt, in dem o.5 ml 4% Wolframatokieselsäure (Lsg. 1) und soviel dest. Wasser (b) vorgegeben, daß a + b = 1 ml ergab.

Nach Zugabe von 2 ml 2-Butanol/Benzol (Lsg. 2) und o.2 ml 1o% Ammoniummolybdat (Lsg. 3) wurde kräftig geschüttelt. Nach völliger Entmischung der organischen und wässrigen Phase, wurde 1 ml aus der organischen Phase in ein Reagenzglas überführt, in dem 2 ml o.73 N H_2SO_4 (Lsg. 5) vorgegeben waren.
Dann wurde o.1 ml $SnCl_2$ (Lsg. 6) hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Die Messung der Probe erfolgte nach 3o min bei 72o nm gegen den Blindwert. Die Eichkurve ergab:
1 µMol P_i/Ansatz = 3.2 Extinktionseinheiten.

2.2.8.2. Phosphatbestimmung in einem Ein-Schritt-Verfahren, modifiziert nach Lin und Morales (3o)

Lösungen:
Lsg. 1: 6 g Ammoniummolybdat und o.6 ml Ammoniak (d = o.91) mit dest. Wasser ad 1oo ml

Lsg. 2: o.141 g Ammoniummetavanadat wurden mit ca. 4o ml heißem Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen wurden o.61 ml HNO_3 (d = 1.42) verdünnt mit 1.4 ml Wasser hinzugegeben und mit dest. Wasser auf 1oo ml aufgefüllt.

Lsg. 3: 12% SDS in dest. Wasser

Phosphat-Reagenz:
Lsg. 1,2 und 3 wurden mit 19.4 ml konzentrierter HNO_3 (d = 1.42) auf 1 Ltr. mit dest. Wasser gebracht.

Durchführung:
1 Aliquot aus dem ATPase-Reaktionsansatz wurde mit dem 5-fachen Volumen Phosphat-Reagenz versetzt und kräftig geschüttelt.
Die Absorption des Phosphat-Molybdatvanadat-Komplexes wurde nach 35 min bei 35o nm (366 nm) in einer 1 cm-Küvette gegen den Blindwert gemessen.

Auswertung:
Eine 1×10^{-4} M Phosphat-Lsg. ergab bei 35o nm eine Extinktion von o.162.
Die Eichkurve verlief linear bei Phosphatkonzentrationen bis zu 5×10^{-4} M.

Die nicht-enzymatische, säurekatalysierte Phosphatfreisetzung aus ATP wurde durch mitgeführte Kontrollwerte bestimmt und die erhaltenen Werte gegen die Kontrollwerte korrigiert.

2.2.9. Natriumdodecylsulfat-Elektrophoresen

Die Herstellung der Lösungen, Gelguß und Durchführung der Elektrophoresen erfolgte unter geringer Modifikation der Methode nach Porzio und Pearson (31)

A) Lösungen:

a) Stammlösungen für den Gelguß

Lsg. 1: 25 g Acrylamid, o.25 g Methylen-bis-acrylamid mit dest. Wasser ad loo ml

Lsg. 2: 2 M Tris/Glycin (o.5 M Tris/1.5 M Glycin), pH 8.8o

Lsg. 3: 5o% Glycerin in dest. Wasser

Lsg. 4: 2.5% SDS/2.5 mM EDTA

Lsg. 5: 1% TEMED (Tetramethyläthylendiamin)

Lsg. 6: 1% Ammoniumpersulfat

b) Überschichtungs-Puffer der Gele

Lsg. 7: 4oo mM Tris/Glycin, pH 8.8o, 5% Glycerin und o.1% SDS

c) Elektroden-Puffer (für Unter- und Oberkammer gleich)

Lsg. 8: 2oo mM Tris/Glycin, pH 8.8o, o.1% SDS

d) Fixations- und Entfärbelösung

Lsg. 9: 14oo ml dest. Wasser, 6oo ml Methanol (technisch) loo ml Eisessig, 12 g TCA

e) Färbelösung

Lsg. 10: 400 ml folgender Stammlsg. wurden mit 10 ml 1% Coomassie Brillantblau gemischt:
Stammlsg. = 6 g TCA in 800 ml dest. Wasser, 200 ml Methanol, 70 ml Eisessig

B) Ansatz zum Gelguß:
10 Teile Acrylamid, 5 Teile Tris/Glycin, 2.5 Teile Glycerin, 1 Teil SDS/EDTA, 4.5 Teile Wasser, 1 Teil TEMED und unmittelbar vor dem Gelguß 1 Teil Ammoniumpersulfat

C) Probenvorbereitung:
Marker-Proteine wurden in Tris/Glycin-Puffer (50 mM Tris/Glycin, pH 8.80, 1% SDS, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) gelöst, 5 min bei 100°C erhitzt und 12 h gegen Tris/HCl-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 mM DTT, 0.2% SDS dialysiert.
Myofibrilläre Proteine wurden in konzentrierter Harnstofflsg. (8 M Harnstoff, 2.5% SDS, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 100 mM Tris/Glycin, pH 8.80) gelöst, 5 min bei 100° erhitzt und erschöpfend gegen 25 mM Tris/HCl, pH 7.4, dialysiert.

D) Durchführung:
Die Mischung wurde in Röhrchen (100 x 6 mm) bis zu einer Markierung eingefüllt, die Oberfläche vorsichtig mit 100 µl Wasser überlagert und ca. 30 min zur Polymerisation ruhig gestellt.
Die Gele wurden dann in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut, das überstehende Wasser entfernt und mit 400 mM Tris/Glycin (Lsg. 7) als Schutzlsg. überschichtet.
Der Elektrodenpuffer (Lsg. 8) wurde in Anoden- und Kathodenraum gefüllt.
Die vorbereitete Proteinprobe wurde auf 20% Glycerin (v/v) gebracht, mit einem Tropfen 0.1% wässrige Bromphenolblau-Lsg. versetzt und unter die Schutzlsg. geschichtet.
Die Proteinkonzentration war letztlich auf 1-2 mg/ml eingestellt; hiervon wurden 10-50 µl aufgetragen.

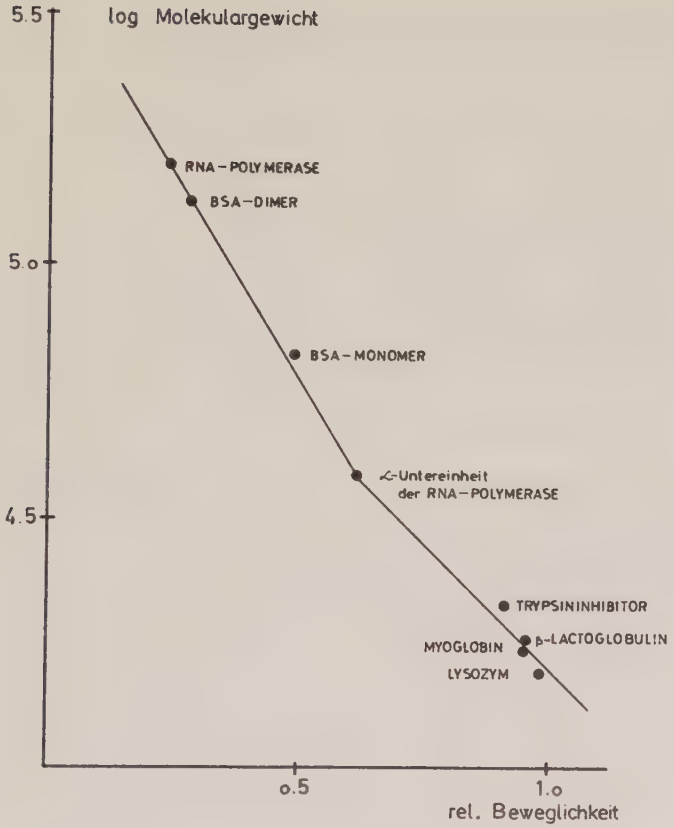


Abb. 2: Eichgerade der SDS-Gelelektrophorese (1o% Acrylamid, o.1% SDS, 4oo mM Tris/Glycin, pH 8.8o, 5% Glycerin)
Folgende Markerproteine wurden benutzt: RNA-Polymerase, MG 16o ooo; Rinderserumalbumin-Dimer, MG 136 ooo; Rinderserumalbumin-Monomer, MG 68 ooo; α-Untereinheit der RNA-Polymerase, MG 39 ooo; Trypsin-Inhibitor, MG 21 5oo; β-Lactoglobulin, MG 18 4oo; Myoglobin, MG 17 2oo; Lysozym, MG 13 93o; Cytochrom C, MG 12 4oo

Die Elektrophorese erfolgte bis zum vollständigen Eindringen der Proteinzone bei 1 mA/Gelröhrchen, anschließend für ca. 4-5 h bei 2-3 mA/Gelröhrchen.
Nach der Entnahme wurde 12 h mit Essigsäure/Methanol (Lsg. 9) fixiert, 6 h in der Färbelsg. inkubiert und anschließend ca. 12 h mit Lsg. 9 entfärbt.

E) Auswertung:
Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der relativen Beweglichkeit, bezogen auf das Cytochrom C, und Auftragung der relativen Beweglichkeit gegen log MG (Molekulargewicht).

2.2.1o. Immunisierungsverfahren nach Gröschelt-Stewart (32)

Das zum Immunisieren verwendete Myosin entstammte den Spitzenfraktionen der DEAE-Sephadex A-5o und DEAE-Sepharose CL-6B-Chromatographie.
Myosin wurde durch Zugabe von 1o Vol. dest. Wasser gefällt (KCl ca. o.o5 M) und in o.9% NaCl-Lösung aufgenommen.

Bei der ersten Injektion der Kaninchen wurde komplettes Freund-Adjuvans verwendet. Gleiche Volumina Proteinlösung (62o µg/ml) und Adjuvans wurden über zwei mit dünnem Schlauch verbundenen Spritzen gründlich emulgiert. Je 5oo µl wurden subcutan und weitere 5oo µl intracutan zu Teilen von ca. 1oo µl entlang der beiden Schulterblätter appliziert.
Nach Ablauf einer Woche erfolgte die zweite Injektion, ohne Adjuvans, mit reinem Antigen in o.9% NaCl-Lösung. Insgesamt 1 ml der fein dispergierten Suspension wurde entlang der beiden Schulterblätter in vielen Quaddeln (5o-1ooµl) intracutan gegeben.
Die dritte Antigen-Gabe, ebenfalls intracutan, erfolgte

nach weiteren 14 Tagen. Zur Vermeidung einer Immun-Paralyse wurde aber nur 5oo µl Antigen (31o µg Protein) pro Tier appliziert.
Ein weiteres "boostern" geschah im 3o-tägigen Abstand, wiederum intracutan, mit 5oo µl Antigen.

2.2.11. Gewinnung von nativen Antikörpern und Anreicherung der Immunglobuline durch Ammoniumsulfatfällung (28,33)

Blut immunisierter Tiere wurde aus einer Ohrvene entnommen, 2 h bei Zimmertemperatur zur Gerinnung gebracht und 12 h bei 4°C im Kühlraum belassen.
Das Serum wurde mit einer Pasteur-Pipette in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt, bei 1o ooo x g 2o min lang zentrifugiert.
Zu 1o ml Antiserum wurden 2.5 g feinst gemahlenes Ammoniumsulfat gegeben und die Lösung 2o h bei Zimmertemperatur stehengelassen, danach 3o min bei 4 ooo x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat mit 2.5 ml 1.75 M $(NH_4)_2$ SO_4-Lösung 2 mal gewaschen und der Niederschlag in wenig Wasser oder Puffer (ATPase-Puffer) gelöst und in kleinen Portionen in Eppendorf-Gefäßen bei -2o°C aufbewahrt.

2.2.12. Ouchterlony-Diffusions-Methode auf Objektträgern (34)

Lösungen:
Lsg. 1 2% Agarose in dest. Wasser

Lsg. 2 NaPP-Stammlsg., 1o-fach konzentriert; 2oo mM NaPP/HCl, pH 8.o, 1o mM EDTA, 1o mM NaN_3; 1o mM DTT

Lsg. 3 2% Agarose in 1/1o NaPP-Stammlsg.

Lsg. 4 Färbelsg.; 1 g Amidoschwarz wird in 1oo ml Entfärbelsg. gelöst, anschließend filtriert

Lsg. 5 Entfärbelsg.; 1 8oo ml Methanol, 2oo ml Eisessig, 2 ml dest. Wasser

Durchführung:
Entfettete Objekträger wurden mit 2% Agarose (Lsg. 1) dünn beschichtet, 1 h im Trockenschrank bei 8o°C getrocknet, anschließend mit 3 ml heißer 2% Agarose (Lsg. 2, 1:1o verdünnt) beschichtet und nach 1o min für 2-4 h in eine feuchte Kammer gestellt. Kurz vor dem Auftragen wurden Löcher mittels Schablone und Korkbohrer ausgestanzt und Antigen und Antikörper nach einem bestimmten Muster eingefüllt (5-1o µl).

Die Objekträger wurden für 18-36 h bei Raumtemperatur in eine feuchte Kammer gestellt, dann zunächst 12 h in 1/1o verdünntem NaPP-Puffer (Lsg. 2) und anschließend 2 h in dest. Wasser differenziert.

Die Gele wurden mit feuchtem Filterpapier luftblasenfrei bedeckt, im Wärmeschrank 3 h bei 4o°C auf das Glas aufgetrocknet und danach 1o min ins Färbebad (Lsg. 4) gestellt. Mit Entfärbelsg. (Lsg. 5) wurde überschüssiges Amidoschwarz entfernt.

Vorbehandlung der Proben:
Myosinlsg. (aus den Spitzenfraktionen der DEAE-Sephadex A-5o-Chromatographie, Proteinkonz.: ca. o.7 mg/ml) wurde 1 h gegen 25 mM Imidazol/HCl-Puffer, pH 7.o, und dann 2 h gegen 2o mM NaPP-Puffer (1/1o Stammlsg. 2) dialysiert. Präzipitiertes Protein wurde durch kurzes Zentrifugieren entfernt.
Antiserum wurde ebenfalls gegen 2o mM NaPP-Puffer dialysiert.

2.2.13. Jodierung von Myosin nach Bolton und Hunter (35,36)

Das Lösungsmittel Benzol des Bolton/Hunter - Reagenzes (N-Succinimidyl 3-(4-hydroxy, 5-(^{125}J)-jodophenylpropionat) wurde vorsichtig durch eingeleiteten N_2-Strom abgedampft, dann wurden o.8 ml Myosinlsg. (Proteinkonz.: 243 µg/ml) in NaPP-Puffer (2o mM NaPP, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 1 mM NaN_3) auf das getrocknete Reagenz (ca. o.3 mCi) gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von o.5 ml o.2 M Glycin in NaPP-Puffer gestoppt und 5 min lang in Eiswasser gestellt.

Das mit ^{125}J-markierte Protein wurde dann durch eine Gelfiltration an Sephadex G-1o von niedermolekularen Reaktionsprodukten getrennt (siehe 3.4).

Anmerkung: Das eingesetzte Myosin entstammte aus einer der Spitzenfraktionen der DEAE-Sephadex A-5o-Chromatographie.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-elektrophorese (SDS-Elektrophorese) der myofibrillären Proteine (Abb. 3)

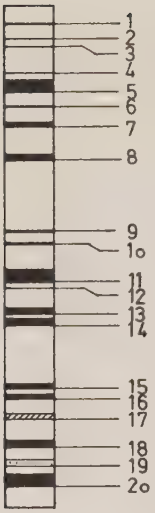
Die SDS-Elektrophorese der myofibrillären Proteine bildete die Grundlage zur Identifizierung der aus den Isolierungsschritten zur Gewinnung von Myosin anfallenden Proteinfraktionen.
Proteine verbinden sich mit SDS zu stäbchenförmigen, geordneten Strukturen, deren elektrophoretische Beweglichkeit als Polyanionen nur noch von der Länge und damit vom Molekulargewicht abhängt (17).
Bei der Auftragung des Logarithmus des Molgewichtes mehrerer Proteine gegen deren relative Beweglichkeit im Polyacrylamidgel - bezogen auf eine Standardsubstanz - erhält man eine Gerade (17,47,48).

Wenn man Proteine mit bekannten Molekulargewicht als Eichsubstanzen (Marker-Proteine) verwendet, kann man auf diese Weise das unbekannte Molgewicht eines Proteines aufgrund dessen relativer Beweglichkeit bestimmen. (Abb. 2 u. Tab. 2)
Cytochrom-C diente als Bezugspunkt, dessen Beweglichkeit gleich eins gesetzt wurde.
Das anfangs benutzte Bromphenolblau lieferte als kleines Molekül eine diffusionsbedingt zu breite Bande.
Myoglobin schied als Bezugspunkt ebenfalls aus, weil es einige Verunreinigungen enthielt und deshalb nur schwer auswertbar war.

Gelzubereitung und Probenvorbehandlung erfolgten unter geringer Modifikation der Methode nach Porzio und Pearson (31).

Die kurze Aufarbeitungszeit zur Gewinnung von Myofibrillen gewährleistete, daß das Bild der Elektrophorese durch proteolytische Abbauvorgänge kaum oder nur wenig verfälscht werden konnte.
Myofibrillen wurden durch 5-minütiges Erhitzen bei 100°C in Harnstoff/SDS unter reduzierenden Bedingungen gelöst. (8 M Harnstoff, 2.5% SDS, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 100 mM Tris/Glycin, pH 8.80).
Die Harnstoff/SDS/Thiol-Denaturierung bewirkt die vollständige Zerstörung der komplexen Struktur der Myofibrillen und Auflösung in die einzelne Proteinkomponenten bzw. Proteinuntereinheiten.

Durch die anschließende Dialyse gegen SDS-Probenpuffer (0.2% SDS, 1 mM DTT, 25 mM Tris/HCl, pH 7.40) zur Entfernung des Harnstoffes verblieben die Proteine im denaturierten Zustand als stark anionische Polypeptidketten.



Bande	Protein
1-4	nicht identifiziert
5	Myosin, schwere Kette
6	M-Linien-Protein
7	C-Protein
8	α-Aktinin
9	nicht identifiziert
1o	nicht identifiziert
11	Actin
12	nicht identifiziert
13	Troponin-T
14	Tropomyosin
15	Myosin- L1
16	Troponin-I
17	Troponin-C
18	Myosin-L2
19	Myosin-L3
2o	Marker-Protein: Cytochrom C

Abb. 3: SDS-Gelelektrophorese der myofibrillären Proteine (Nach Porzio und Pearson (31); 1o% Acrylamid, o.1% SDS, 4oo mM Tris/Glycin, pH 8.8o, Kathode oben, Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue)

Tabelle 2: Molekulargewichte der myofibrillären Proteine

Bande	Protein	Molgewichte	
		eigene Werte	Werte nach Porzio et al
1-3	nicht identifiziert	>270 000	——
4	" "	224 000	——
5	Myosin, schwere Kette	199 500	200 000
6	M-Linien-Protein	174 000	195 000 (α-Kette) 180 000 (β-Kette)
7	C-Protein	147 900	140 000
8	α-Aktinin	114 800	102 000
9	nicht identifiziert	63 100	——
10	" "	57 500	——
11	Actin	45 700	45 000
12	nicht identifiziert	42 600	——
13	Troponin-T	37 200	37 000
14	Tropomyosin	35 500	35 000
15	Myosin-L1	25 100	25 000
16	Troponin-I	24 000	24 000
17	Troponin-C	21 900	20 000
18	Myosin-L2	18 200	18 000
19	Myosin-L3	17 000	15 000

3.2. Isolierung von Myosin

3.2.1. Gewinnung von Rohmyosin

Die Isolierung erfolgte bis zur Stufe des Rohmyosins in Abwandlung der Methoden verschiedener Autoren (14,16,22,37,39,41).
Dabei bedeutet der Begriff "Rohmyosin" die Myosinpräparation, die man durch Extraktion, Fällung durch Herabsetzen der Ionenstärke, Ultrazentrifugation und Salzfällung erhält.

Im folgenden soll das Prinzip der einzelnen Schritte kurz erläutert werden:
a) Gewinnung von Myofibrillen:
Zunächst werden die wasserlöslichen Proteine des Sarcoplasmas, die 2o-25% des Proteins der Muskelzellen ausmachen, durch eine Pufferlösung niedriger Ionenstärke ausgewaschen.
Dieser Schritt bewirkt die Abtrennung der myogenen von der wasserunlöslichen myofibrillären Fraktion und außerdem werden Abbauvorgänge durch freigesetzte Proteasen auf ein Minimum herabgesetzt.

b) Erste Extraktion:
Die Myofibrillen werden dann mit 4 Volumina Pufferlösung hoher Ionenstärke (o.37 M KCl) extrahiert; kurze Extraktionszeiten vermindern die Solubilisierung von Actin (39).
Natriumpyrophosphat als Zusatz im Extraktionspuffer (1o mM) bewirkt eine Reduzierung der Interaktionen zwischen Myosin und Actin und steigert somit den Ertrag an Myosin (37,38,39)

c) Fällung durch Herabsetzen der Ionenstärke:
Die Proteinlösung (o.3 M KCl) wird durch Zugabe von 1o Volumina dest. Wasser gefällt (o.o27 M KCl). Durch diesen Schritt wird Myosin präzipitiert und von kontaminierenden Proteinen getrennt (39,4o).

d) Zweite Extraktion:
Das Sediment der Fällung wird mit 3-4 Volumina Pufferlösung hoher Ionenstärke (o.5 M KCl, 5o mM Tris/HCl, pH 7.6o, 1 mM EDTA, 6 mM $MgCl_2$ und o.1 mM DTT) homogenisiert und extrahiert; mittels 1o-fach konzentrierter, neutraler ATP-Lösung (sonst Säure-Denaturierung!) auf 4 mM ATP gebracht.
Das ATP/Mg^{++} - Milieu bewirkt die weitgehende Dissoziation von Actomyosin in Actin und Myosin (38).

e) Ultrazentrifugation nach Weber:
Dieser Schritt (Zentrifugation bei 1oo ooo x g, 9o min) trennt Myosin vom schneller sedimentierenden F-Actin und noch undissoziiertem Actomyosin (38,41,42).

f) Ammoniumsulfat-Fällungen:
Die Wirksamkeit von Ammoniumsulfat als Fällungsmittel beruht auf der Ausnutzung der Dipolnatur der Proteine. Dabei entzieht das Salz den Eiweißmolekülen das Hydratwasser, das gegensätzlich orientierte Dipole voneinander abschirmt, so daß es zur Aggregatbildung kommt. Die Proteine mit dem höheren Dipolmoment flocken zuerst aus. Actin wird erst bei 38% Sättigung vollständig präzipitiert (eigene Beobachtung), während Myosin zwischen 38% und 5o% Sättigung angereichert wird (16,38).

3.2.1.1. Vergleich der beiden Präparationsverfahren

Das Ziel,der in den beiden Präparationsverfahren angeführten Reinigungsschritte, war, ein Ausgangsmaterial für die weitere chromatographische Reinigung zu gewinnen, aus dem Actin und Actomyosin weitgehend eliminiert worden war.
Doch zeigten SDS-Elektrophorese-Kontrollen und Superpräzipitationsexperimente, daß das Endprodukt des ersten Verfahrens noch immer erhebliche Kontaminationen an Actin und Actomyosin aufwies.
Durch Modifikation und Erweiterung konnten die oben geschilderten Nachteile im zweiten Verfahren vermieden werden:

- vom Überstand der Ultrazentrifugation wurden nur die oberen zwei Drittel verwendet und zwei zusätzliche Ammoniumsulfat-Fällungen gewährleisteten ein Präparat, das frei von Actin und Actomyosin war.

Außerdem wurde auf die relativ teuere Ribonuclease-Behandlung verzichtet; die dadurch verminderte Belegkapazität des Ionenaustauschers wurde durch eine erhöhte Säulendimensionierung ausgeglichen.
Im folgenden wird das zweite, verbesserte Verfahren im Flußdiagramm und in einer Wertetabelle dargestellt.

Flußdiagramm des zweiten Präparationsverfahren

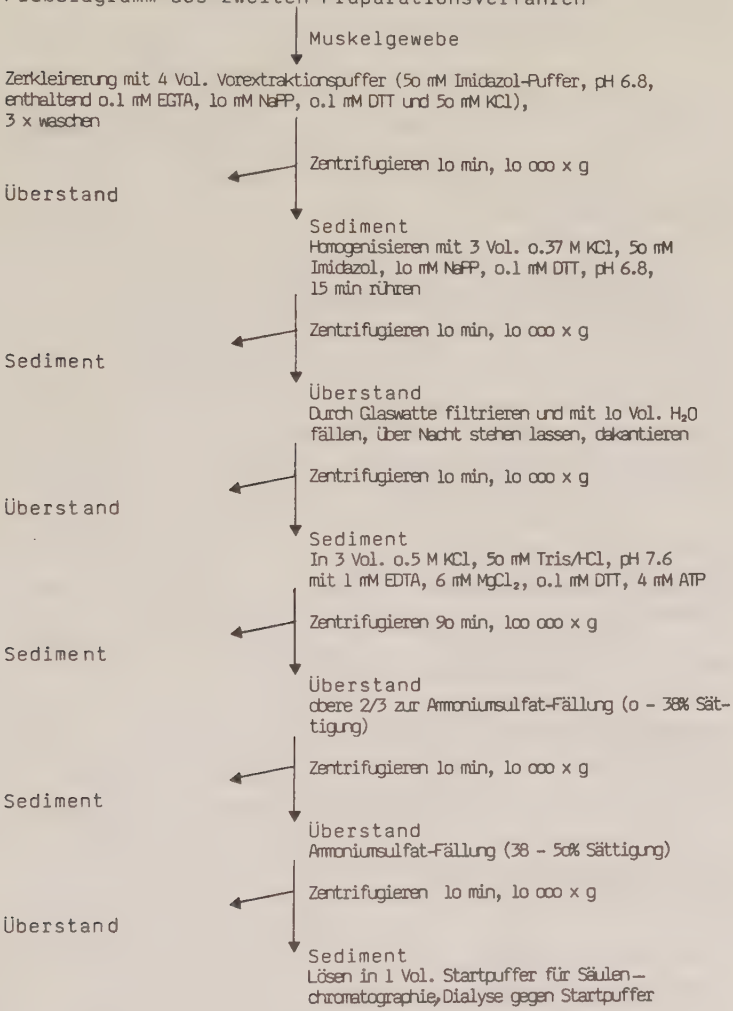


Tabelle 3: Gewinnung von Rohmyosin nach dem 2. Präparationsverfahren

Schritt	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Ausbeute (%)
151 g Muskel wurden mit 3 Vol. Imidazolpuffer zerkleinert, 3 x gewaschen				
Sediment mit 588 ml 0.37 M KCl 1o min homogenisiert	744	11.8	8779	1oo%
Zentrifugation, Pellet verworfen, Überstand über Glaswolle filtriert	42o	4.6	1932	22%
Fällung mit 1o Vol. dest. Wasser, Zentrifugation, Lösen des Sedimentes in o.5 M KCl	372	4.7	1762	2o%
37o ml Probe mit 3o ml neutraler 4o mM ATP-Lsg. versetzt, Zentrifugation 15o min bei 1oo ooo x g, Überstand, oberen 2/3	26o	3.2	832	9.5%
258 ml Probe werden auf 38% AS-Sättigung gebracht, Zentrifugation, Überstand	416 312	1.5	468	5.3%
31o ml Probe werden auf 5o% AS-Sättigung gebracht, Zentrifugation	384			
Das Sediment wird in 4o mM NaPP gelöst	58	6.4	371	4.2%

Die Ausbeute an Rohmyosin betrug: 2.5 mg Protein/g Feuchtgewicht Muskel

3.2.1.2. Verlaufskontrolle bei der Gewinnung von Rohmyosin nach dem zweiten Verfahren anhand von SDS-Elektrophoresen

Die SDS-Elektrophorese-Kontrolle der wichtigsten Schritte (siehe Abb. 4:) zeigte folgenden Verlauf:

a) Die Extraktion in o.37 M KCl (Gel 1) wies einen hohen Anteil an Myosin und Actin auf, während die restlichen myofibrillären Proteine schwächer vertreten waren.

b) Im Sediment der Ultrazentrifugation (Gel 2) war Actin die Hauptkomponente; einen geringeren Anteil nahm Myosin (schwere Ketten) bzw. Actomyosin ein.

c) Im Überstand der Ultrazentrifugation (Gel 3) überwog Myosin anteilsmäßig bei weitem, aber Actin war, neben einer noch schwächeren Verunreinigung an M-Linien-Protein, noch aufzuweisen.

d) Die 38% Ammoniumsulfat-Fällung zeigte die Verschiebung des Actins in das Sediment (Gel 4) und die Anreicherung des Myosins im Überstand (Gel 5), aber auch den relativ großen Verlust an Myosin in das Sediment.

e) Im Sediment der 5o% AS-Fällung (Gel 6) war das Proben-Material frei von Actin und wies Myosin als anteilsmäßig stärkste Komponente aus.
Das Material zeigte eine deutliche Kontamination an α-Aktinin, eine schwächere an M-Linien-Protein und einen unbekanntem Protein (proteolytisches Fragment?).

Abb. 4: SDS-Gelelektrophorese der Gewinnung von Rohmyosin (Nach Porzio und Pearson (31), 10% Acrylamid, 0.1% SDS, 400 mM Tris/Glycin, pH 8.80; Kathode oben, Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue)

Gel 1 = Extraktion in 0.37 M KCl
Gel 2 = Sediment der Ultrazentrifugation
Gel 3 = Überstand der Ultrazentrifugation
Gel 4 = Sediment der 38% AS-Fällung
Gel 5 = Überstand der 38% AS-Fällung
Gel 6 = Sediment der 50% AS-Fällung

3.2.2. Chromatographieverfahren zur Reinigung des Rohmyosins

a) Ionenaustauscher (24,25)

In der vorliegenden Arbeit wurden die Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-5o und DEAE-Sepharose CL-6B verwendet.

An die Matrix (Sephadex G-5o bzw. Sepharose CL) dieser Austauscher ist als geladene funktionelle Gruppe Diäthylaminoäthyl (DEAE) über Ätherbindungen chemisch gebunden.

Durch die feste Ankergruppe (DEAE) besitzt der Austauscher die Fähigkeit mit Gegen- oder Coionen in Wechselwirkung zu treten, die bei der Regeneration, einer Salzbildung, eingeführt werden.

Beim eigentlichen Trennversuch werden diese Coionen gegen Ionen der aufgegebenen Lösung ausgetauscht, während die verdrängten Gegenionen mit den nicht adsorbierten Teilen des Probengemisches im Eluat erscheinen.

Das festgehaltene Material kann anschließend durch Verdrängung mit Salzlösungen oder über pH-Verschiebungen durch Verringerung der Adsorptionskräfte fraktionierend vom Austauscher heruntergewaschen werden.

b) Hydroxylapatit (43)

Der Mechanismus der Retention von Polyanionen an Hydroxylapatit beruht auf Interaktionen zwischen den negativ geladenen Gruppierungen der Polyanionen und den positiv geladenen Ca^{++}-Ionen auf der Oberfläche der Hydroxalapatit-Kristalle.

Bei einem Proteingemisch ist der Grad der Bindung der verschiedenen Proteine proportional dem Gehalt ihrer sauren Aminosäurereste (44).

Naturgemäß können andere negativ geladene Gruppen, wie z.B. Phosphationen, mit diesen Aminosäureresten um die

Bindungsstellen konkurrieren.
Auf diese Weise kann mit einem Phosphat-Gradienten an Hydroxylapatit gebundenes Protein fraktionierend heruntergewaschen werden.
Adsorptions- bzw. Desorptionsmechanismen von Polyanionen an Hydroxylapatit werden nur unwesentlich von der Gesamt-Ionenstärke beeinflußt (44), so daß sich das Trennverfahren an Hydroxylapatit zur Reinigung von Myosin in hervorragender Weise eignet.

c) Auswertung der Chromatographien
Der Verlauf der verschiedenen Chromatographien wurde in einer Durchflußzelle durch kontinuierliche Messung der UV-Absorption des Eluates bei 280 nm verfolgt.
Bei Verwendung eines Salzgradienten (KCl) wurde dessen Linearität durch Ausmessen der Leitfähigkeit der Fraktionen überprüft und deren KCl-Molarität anhand einer Eichkurve bestimmt.
Die Proteinkonzentration der Fraktion wurde über die UV-Absorption bei 280 und 260 nm nach der Formel von Kalckar (23) bestimmt.
Die in der Chromatographie getrennten Proteinfraktionen wurden über die Ermittlung des Molekulargewichtes durch SDS-Elektrophorese den entsprechenden Muskelproteinen zugeordnet.
Myosin wurde desweiteren über seine enzymatische Eigenschaft als ATPase identifiziert, (methodisches siehe 2.2.7.).

3.2.2.1. Chromatographie an DEAE-Sephadex A-5o (Abb. 5)

Die Chromatographie wurde nach Richard et al (22) durchgeführt. Ausgangsmaterial war Rohmyosin, das nach dem ersten Präparationsverfahren (siehe 2.2.1.1.) gewonnen worden war.
Die Proteinlösung wurde auf den mit Startpuffer (4o mM NaPP/HCl, pH 7.5o) äquilibrierten Austauscher aufgetragen und nicht adsorbiertes Protein mit dem gleichen Puffer heruntergewaschen (Peak 1).
Ab Fraktion 45 wurde ein linearer KCl-Gradient angelegt. Das adsorbierte Protein wurde als scharfer, symmetrischer Peak bei einer KCl-Konzentration von o.14 M (Fraktion 59) eluiert; in ihm war die Myosin-ATPase-Aktivität enthalten.
Von der Spitzenfraktion 59 wurde

—·— der UV-Quotient A_{28o}/A_{26o} zu 1.39 und

—— die spezifische ATPase-Aktivität zu 1.o2 $\mu Mol P_i$/min/mg Protein

bestimmt.
Bis auf die geringere Ausbeute an Protein von ca. 7o%, von Richard et al (22) werden 92-97% angegeben, sind die, die Chromatographie charakterisierenden Werte, durchweg vergleichbar:

spez. ATPase-Aktivität (µMol/min/mg Protein)	Richard et al zwischen 1-1.3	eigene Werte 1.o2
Elution des "Myosin"-Peak	o.13 M KCl	o.14 M KCl

Die SDS-Elektrophoresen der Spitzenfraktionen 15 und 59 (Abb. 8: Gel 5 und 6) ermöglichen folgende Aussagen:
Im 1. Peak wurde hauptsächlich α-Aktinin und, wesentlich schwächer, Myosin (aggregiertes?) eluiert:

Der 2. Peak enthielt als Hauptkomponente Myosin, daneben noch drei schwächere Verunreinigungen; M-Linien-Protein, C-Protein und ein nicht identifiziertes Protein.
In den beiden Peaks der Fraktionierung war Actin nicht nachzuweisen.

Die Fraktionierung an DEAE-Sephadex A-5o führte zwar zur erwarteten Aufspaltung, blieb aber im ganzen unbefriedigend:
Der Ionenaustauscher schrumpft bei hohen Ionenstärken ab o.2 M KCl auf ca. die Hälfte des ursprünglichen Bettvolumens (25).
Reproduzierbare Durchflußraten bzw. konstante Franktionsvolumina waren mittels hydrostatischen Druckes nicht gewährleistet. Dies war einzig durch Einsatz einer Schlauchpumpe zu erreichen.
Aufgrund des Schrumpfungsprozesses nach Anlegen des Salzgradienten konnte der Austauscher nicht in der Säule regeneriert und äquilibriert werden.
Desweiteren zeigte die SDS-Elektrophorese-Kontrolle, daß nur das obere Drittel des Überstandes der Ultrazentrifugation genügend frei von Actin und Actomyosin war.
Die angeführten Nachteile führten zu der erweiterten zweiten Präparation (siehe 2.2.1.2.), die im wesentlichen zwei Ammoniumsulfatfällungen nach dem Ultrazentrifugationsschritt beinhaltete, und Ersatz von DEAE-Sephadex A-5o durch DEAE-Sepharose CL-6B.

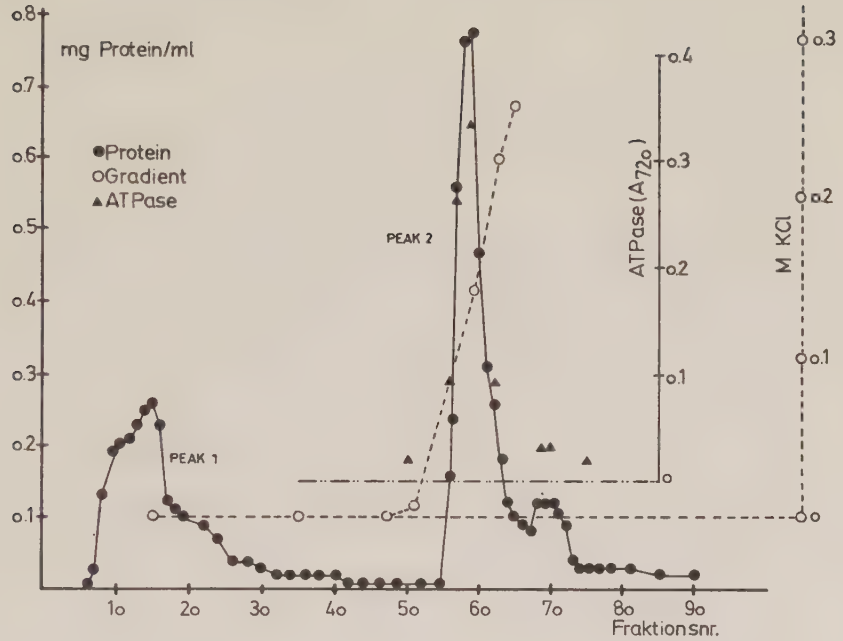


Abb. 5 : Chromatographie von Myosin an DEAE-Sephadex A-50

Auf eine 2.5 x 38 cm Säule wurden 142 mg Protein aufgetragen; die Elutionsgeschwindigkeit betrug 20 ml/h; das Fraktionsvolumen 13.5 ml

3.2.2.2. Chromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B (Abb. 6)

Der Austauscher weist gegenüber DEAE-Sephadex A-5o einige beträchtliche Vorteile auf:
Auch bei hohen Ionenstärken bleibt das Bettvolumen konstant; er zeigt gleichmäßige und hohe Durchflußraten.
Desweiteren kann das Gel in der Säule regeneriert und äquilibriert werden. Die Bindungskapazität beider Austauscher ist in etwa gleichzusetzen.
Die Fraktionierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die an DEAE-Sephadex A-5o unter Benutzung eines kontinuierlichen Salzgradienten von o - o.5 M KCl.

Der "Myosin"-Peak (Peak 2) erschien ebenfalls bei einer KCl-Konzentration von o.14 M (Fraktion 74).
Der UV-Quotient A_{28o}/A_{26o} der Spitzenfraktion 74 betrug 1.49; die spezifische ATPase-Aktivität war 1.55 µMolP_i/min/mg Protein.

Es wurden ca. 87% des eingesetzten Proteins im Eluat wiedergefunden.
Die SDS-Elektrophorese der Spitzenfraktionen 15 und 74 (Abb. 8: Gel 1 und 2) ergab folgendes Bild:
Im 1. Peak wurde Myosin, C-Protein und als Hauptkomponente α-Aktinin eluiert.
Der 2. Peak enthielt hauptsächlich Myosin, als schwächere Verunreinigung α-Aktinin, als sehr schwache Bande C-Protein und desweiteren ein nicht identifiziertes Protein (MG ca. 76 ooo). Wahrscheinlich handelte es sich hier um ein proteolytisches Spaltfragment.
Beim Erscheinen von Myosin im 1. Peak handelte es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um eine Überladung der Belegkapazität des Austauschers.
Dies müßte erst experimentell abgesichert werden.
Weiterhin auffällig war der hohe Anteil von α-Aktinin im 1. Peak.

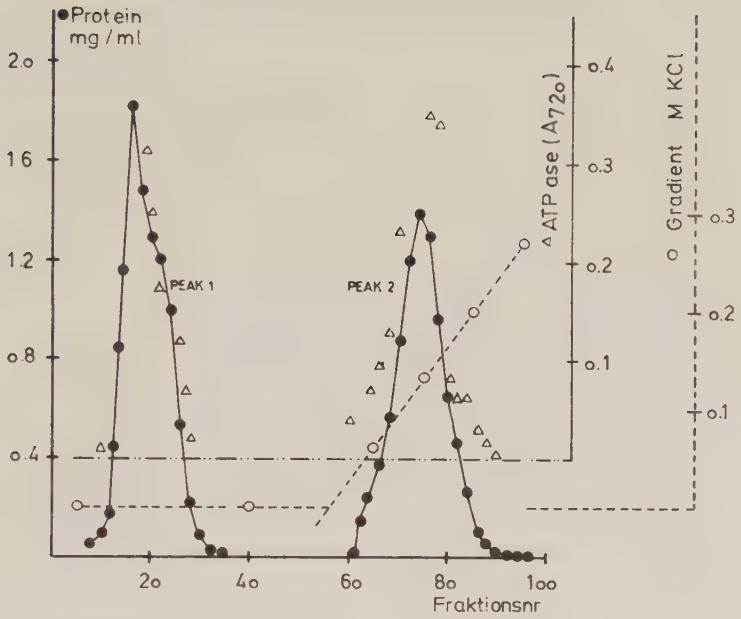


Abb. 6: Chromatographie von Myosin an DEAE-Sepharose CL-6B

Säulengröße: 2.5 x 45 cm; Protein-Auftrag: 406 mg;
Durchflußrate: 22.4 ml/h; Fraktionsvol.: 10.2 ml;
Gradientenanschluß: ab Fraktion 40;
Gradient: Linear, je 500 ml 0.04 M NaPP/pH 7.50
und 0.5 M KCl, 0.04 M NaPP/pH 7.50

3.2.2.3. Chromatographie der DEAE-Sepharose CL-6B-Fraktionen an Hydroxylapatit (Abb. 7)

Ausgangsmaterial waren die vereinigten Fraktionen 67-8o der DEAE-Sepharose CL-6B-Chromatographie. Die Fraktionierung erfolgte nach Mozersky et al (45,46) über einen Stufengradienten (o.16 M Phosphatpuffer, pH 6.8, o.4 M KCl ⟶ o.2o M Phosphatpuffer, pH 6.8, o.4 M KCl ⟶ o.23 M Phosphatpuffer, pH 6.8, o.4 M KCl).
Myosin (Peak 2) wurde bei o.2 M Phosphat eluiert. Der UV-Quotient $A_{28o}:A_{26o}$ der Spitzenfraktion 4o betrug 2.4 und die Wiederfindung an Protein ca. 76%.
Die SDS-Elektrophoresen (Abb. 8 : Gel 3 und 4) zeigten, daß im 1. Peak (Fraktion 17) hauptsächlich α-Aktinin und Proteine oder Proteinfragmente im Molbereich der leichten Ketten von Myosin eluiert wurden.
Der 2. Peak (Fraktion 4o) enthielt nahezu ausschließlich Myosin, als Verunreinigung erschien eine schwache Bande im Molbereich des C-Proteins.
α-Aktinin, das im 1. Peak erschien, war vollständig von Myosin abgetrennt.
Hier bietet sich unter Umständen nach Modifizierung der Anfangsbedingungen der Chromatographie die Möglichkeit, α-Aktinin weitgehend rein zu gewinnen.

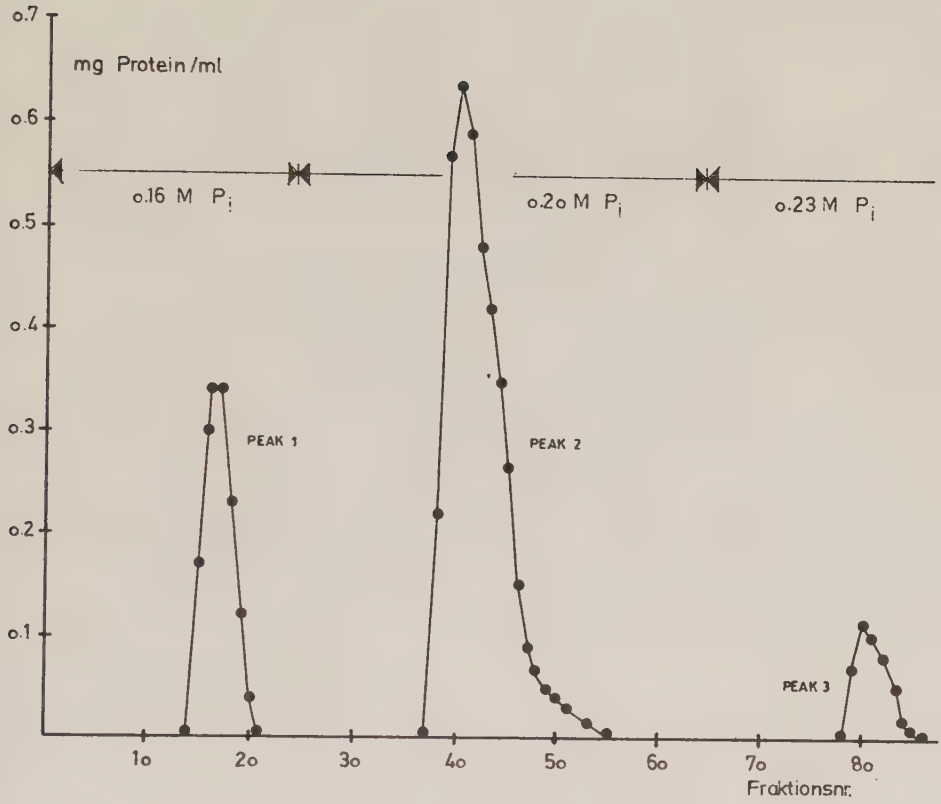


Abb. 7: Chromatographie an Hydroxylapatit (HT-Bio-Rad)

Säule: 1.2 x 14 cm, Protein-Auftrag: 89 mg,
Flußrate: 11.4 ml/h,
Fraktionsgröße: 3.8 ml,
Elution: Stufengradient von 0.16 M Phosphat
(pH 6.8, 0.4 M KCl) ⟶ 0.20 M Phosphat
(pH 6.8, 0.4 M KCl) ⟶ 0.23 M Phosphat
(pH 6.8, 0.4 M KCl)

Abb. 8: SDS-Elektrophorese der verschiedenen Chromatographien

(Nach Porzio und Pearson (31); 1o% Acrylamid, o.1% SDS, 4oo mM Tris/Glycin, pH 8.8o, Kathode oben, Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue)

a) DEAE-Sepharose CL-6B-Chromatographie:
   Gel 1 = Fraktion 15; Gel 2 = Fraktion 74
b) HT-Chromatographie:
   Gel 3 = Fraktion 17; Gel 4 = Fraktion 4o
c) DEAE-Sephadex A-5o-Chromatographie:
   Gel 5 = Fraktion 15, Gel 6 = Fraktion 59

3.3. Biochemische Charakterisierung des hochgereinigten Myosins

Für die kinetischen Messungen wurde Myosin aus den Spitzenfraktionen der DEAE-Sepharose CL-6B-Chromatographie sowie der Hydroxylapatit-Chromatographie verwendet.
Das bei der hydrolytischen Spaltung von ATP freigesetzte anorganische Phosphat wurde entweder

a) gemäß Pollard und Korn (29) nach Extraktion des gelben Phosphomolybdat-Komplexes in die organische Phase und anschließender Reduktion, bei 720 nm, oder
b) nach Lin und Morales (30), in einem Ein-Schritt-Verfahren, als Phosphomolybdat-Komplex, bei 350 nm (366 nm), bestimmt.

Eine "burst"-Reaktion der ATPase (49) wurde unter diesen Meßbedingungen nicht beobachtet, da nur freigesetztes anorganisches Phosphat, nicht aber auch Myosin-gebundenes Phosphat bestimmt wurde.
Somit wurden nur Reaktionsgeschwindigkeiten im "steady state" gemessen.

3.3.1. Bestimmung der Michaeliskonstante der Ca^{++}-aktivierten Myosin-ATPase (Abb. 9)

Die Substratabhängigkeit der Ca^{++}-aktivierten ATPase wurde nach der Methode von Lineweaver und Burk (50) bei Substratkonzentrationen im Bereich von 4 mM - 0.25 mM ATP untersucht.
Durch die gewählte geometrische Verdünnungsreihe lagen die Meßpunkte bei der doppelt-reziproken Auftragung im gleichen Abstand zueinander und ergaben innerhalb der üblichen Fehlergrenzen stets Geraden.
Substrathemmung trat im vorgegebenen Substratbereich nicht auf.

Der ermittelte K_M-Wert von o.2 mM ist naturgemäß von den Reaktionsbedingungen abhängig (51), daher ist ein Vergleich mit aus der Literatur angegebenen K_M-Werte schwierig.
Nach Wikmann-Coffelt (52) beträgt er o.4 mM, Brahms und Kay (53) ermittelten einen Wert von o.1 mM, während Morales und Hotta (54) den K_M-Wert mit o.2 mM angaben.

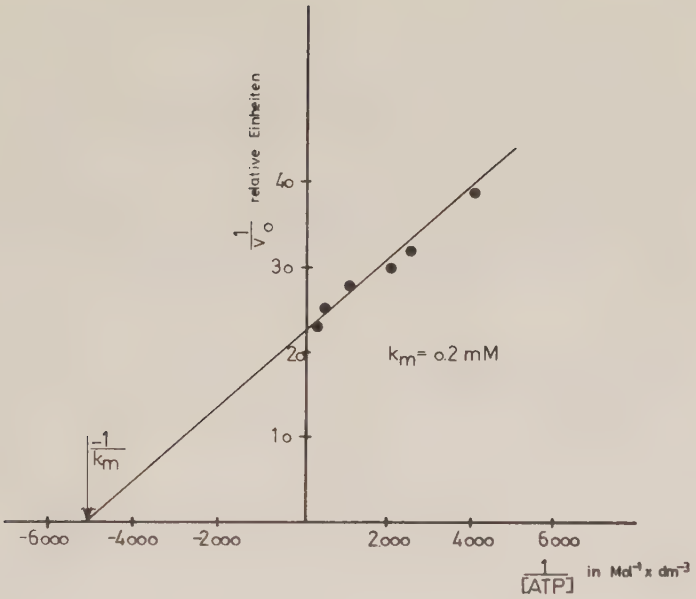


Abb. 9: Michaelis-Konstante nach Lineweaver-Burk von Ca^{++}-aktivierter Myosin-ATPase

Konzentration im Test: o.5 M KCl, 5o mM Tris/HCl, pH 7.5o, 1 mM $CaCl_2$, o.141 mg Myosin/ml. Myosin stammte aus der Spitzenfraktion 76 der DEAE-Sepharose CL-6B-Fraktion.
Freigesetztes anorganisches Phosphat wurde bei 72o nm nach Pollard und Korn bestimmt.
Die Anfangsgeschwindigkeit v_o wird als ΔA_{72o}/min ausgedrückt.
Die Messung erfolgte bei 25°C.

3.3.2. Ca^{++}- Ionen als Aktivatoren der Myosin-ATPase

Als Index der Myosin-ATPase-Aktivität wird gewöhnlich die Ca^{++}-aktivierte ATPase (1-1o mM) in Lösungen hoher Ionenstärke (z.B. o.5 M KCl) bei neutralem oder leicht alkalischem pH-Milieu angesehen (2).
Eine Erhöhung der Ca^{++}-Konzentration von o.1 mM auf 4 mM ließ die Anfangsgeschwindigkeit v_o unter den gegebenen Meßbedingungen auf etwa den 4-fachen Wert ansteigen.

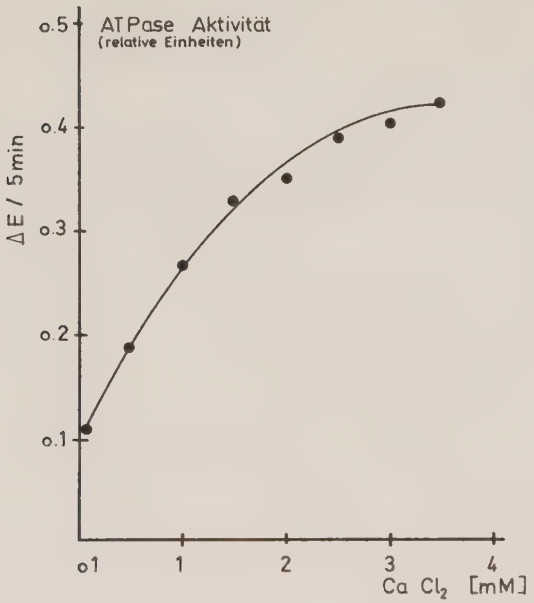


Abb.1o: Einfluß der Ca^{++}-Konzentration auf die ATPase-Aktivität von Myosin

Konzentrationen im Ansatz nach Start der Reaktion: o.5 M KCl, 2 mM ATP, 5o mM Tris/HCl/pH 7.5o, o.1o2 mg Myosin/ml (DEAE-Sepharose CL-6B-Fraktion). Die Messung erfolgte bei 25°C. Freigesetztes anorg. Phosphat wurde nach Lin und Morales bei 366 nm bestimmt (3o).

3.3.3. Hemmung der Myosin-ATPase durch Mg^{++}-Ionen

Es wurde der aus der Literatur bekannte Hemmeffekt (15) der Myosin-ATPase durch Mg^{++}-Ionen untersucht.
Der Ansatz, in dem Ca^{++} durch Mg^{++} ersetzt wurde, zeigte eine vollständige Hemmung der ATPase-Aktivität (siehe Abb.11)
In Abb.12 : wurde durch Zugabe eines kleinen Volumens konzentrierter $MgCl_2$-Lösung der Hemmeffekt der Mg^{++}-Ionen auf die Ca^{++}-aktivierte Myosin-ATPase demonstriert.

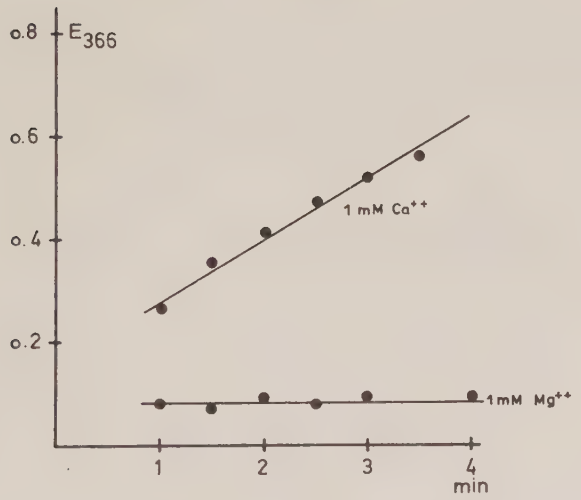


Abb.11: Hemmeffekt von Mg^{++}-Ionen auf die ATPase-Aktivität von Myosin

Konzentrationen im Ansatz: 0.5 M KCl, 2 m ATP, 50 mM Tris/HCl/pH 7.50, 0.47 mg Myosin/ml (konzentriertes Protein aus der Hydroxylapatit-Fraktion).
Temperatur: 25°C.
Messung des anorg. Phosphates bei 366 nm nach Lin und Morales (30).

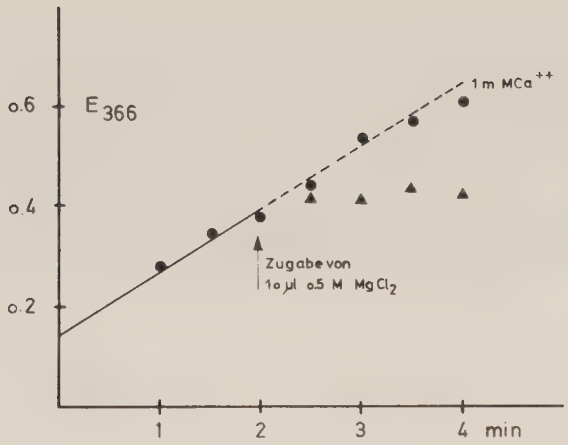


Abb.12: Hemmeffekt von Mg^{++}-Ionen auf die ATPase-Aktivität von Myosin

Messbedingungen siehe Abb.11:

3.3.4. Einfluß der Temperatur auf die Myosin-ATPase

Die hydrolytische Spaltung von ATP wurde in Tris/HCl-Puffer, pH 7.5o bei acht verschiedenen Temperaturen gemessen.

3.3.4.1. Temperatur - Optimum

Wie Abb.13: zeigt, lag das Temperatur-Optimum der Myosin-ATPase unter den vorgegebenen Meßbedingungen bei ca. 35°C. Ab 41°C erfolgte ein rascher Aktivitätsverlust.

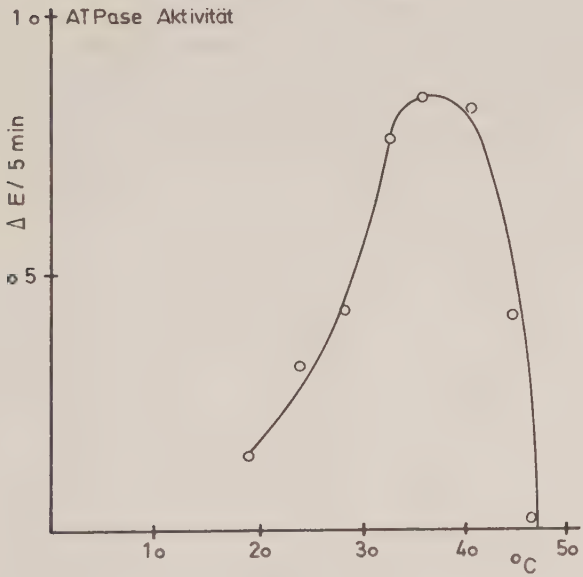


Abb.13: Temperaturabhängigkeit der Ca^{++}-aktivierten Myosin-ATPase
Bedingungen im ATPase-Nachweis:
o.5 M KCl, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM ATP, 5o mM Tris/HCl, pH 7.5o, o.o9 mg Myosin/ml. Freigesetzes anorg. Phosphat wird nach Lin (3o) nach einem modifizierten Verfahren, bei 366 nm bestimmt.

3.3.4.2. Arrhenius - Diagramm

Es wurden die V_{max} -Werte der verschiedenen Temperaturen logarithmiert und gegen 1/T aufgetragen.
Wie Abb.14: zeigt, verliefen die Werte im Intervall von 19° - 35,5°C linear.
Dies kann als Hinweis gedeutet werden, daß sich die Konformation des Enzym - Substrat - Komplexes innerhalb dieses Temperaturbereiches nicht ändert.
Die aus der Steigung der Kurve (5o) ermittelte Aktivierungsenthalpie $H^{\#}$ bei 25°C betrug 18.4 Kcal/Mol.
Dieser Wert ist äußerst schwierig mit den aus der Literatur bekannten Werten (51,53,55,56), im Bereich von 2.4 - 12.9 Kcal/Mol, vergleichbar. Die Meßbedingungen, unter denen diese Bestimmungen erfolgten, waren sehr unterschiedlich in bezug auf: pH, Ionenstärke, Ca^{++}-Konzentration, Puffersystem, "Myosin"-Präparation.

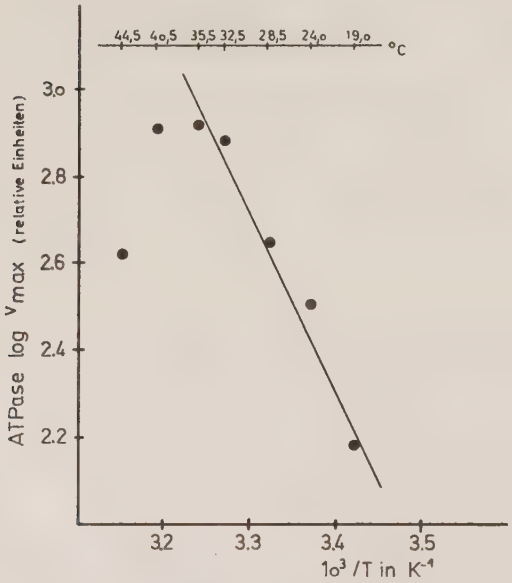


Abb.14: Arrhenius-Diagramm

Bedingungen im ATPase-Nachweis siehe Abb.13:

3.4. Darstellung der gegen Myosin gerichteten Antikörper

3.4.1. Ouchterlony-Diffusions-Test

Der Test wurde als Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (28,34,55) auf Agar-beschichteten Objekträgern durchgeführt. Die Durchführung ist im methodischen Teil (siehe2.2.12.) ausführlich beschrieben.
Der Test zeigte ausgeprägte Präzipitationslinien zwischen Myosin (M) und Antiserum aus "Tier 1" (Kaninchen, Weißer Neufundländer), schwächere mit "Tier 3".
Mit den Antiseren der Tiere 2 und 4 war keine Präzipitationsreaktion nachzuweisen. Dies kann auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein: Der Äquivalenzpunkt der Antigen/Antikörper-Reaktion war aufgrund der Konzentrationen der beiden Reaktanten nicht erreicht; zum anderen konnte wegen des anfänglich angewandten Immunisierungsverfahrens eine Immunparalyse aufgetreten sein.

Abb.15: Immundiffusion von Myosin gegen Kaninchen-Antiserum
M = Myosinlsg. aus den Spitzenfraktionen der DEAE-Sephadex-A-5o-Chromatographie, jeweils lo µl mit einer Proteinkonzentration von o.7 mg/ml
1-4 = Antiseren von 4 Versuchstieren, jeweils lo µl und unverdünnt. Die Gele wurden mit Amidoschwarz (1 g/loo ml) gefärbt.

3.4.2. Hemmung der Myosin-ATPase-Aktivität durch Antikörper gegen Myosin (Abb. 16)

Der Versuch, der nach Bruggmann und Jenny (57) durchgeführt wurde, sollte die Frage klären, inwieweit die Antiseren (Gewinnung siehe 2.2.1o.) in der Lage waren, die ATPase-Aktivität von Myosin herabzusetzen.
Dem liegt die Annahme zugrunde, daß ein Molekül der Größe des Myosins (Molekulargewicht ca. 5oo ooo) weit mehr als nur eine antigene Determinante besitzt.
Eine der antigenen Determinanten könnte dann die Bildung einer Klasse von Antikörpern initiieren, die gegen das aktive Zentrum der ATPase-Aktivität gerichtet ist.

Im Hemmversuch wurden 7oo µl ATPase-Puffer (5o mM Tris/HCl, pH 7.5o, o.5 M KCl, 36 µl Myosinlsg. (DEAE-Sepharose CL-6B-Fraktion) und 64 µl Antiserum der entsprechenden Verdünnung 12 h bei 4°C inkubiert.
Nach Erwärmen der Proben auf 25°C wurde die verbliebene ATPase-Aktivität bestimmt (siehe unter 2.2.7.).
In den Kontrollen (1oo%-Werte) wurde Serum nicht-immunisierter Tiere eingesetzt. Abb.16: zeigt deutlich die ATPase-Hemmung durch Antiseren, die aus verschiedenen Tieren gewonnen wurden.
Die Versuche sind rein qualitativ zu bewerten, doch werden offentsichtlich recht hohe Konzentrationen an Antiserum benötigt, um die ATPase-Aktivität vollständig zu hemmen (57).
Dies wird in Kurve c verdeutlicht; hierbei wurde eine aus Antiserum (Tier 7234, Kurve a) durch $(NH_4)_2\ SO_4$-Fällung ca. 1o-fach angereicherte Menge Antikörper eingesetzt.

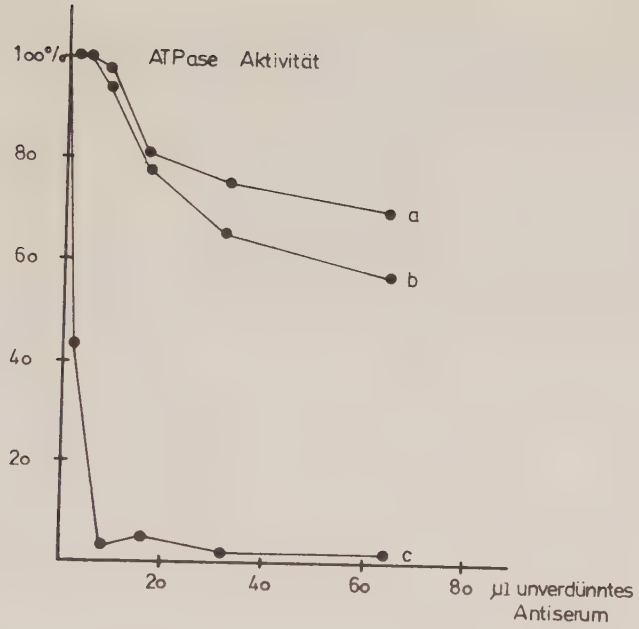


Abb.16: Hemmung der Myosin-ATPase durch Antiseren gegen Myosin

Kurve a und b: Antiseren von verschiedenen Tieren;

Kurve c: Durch AS-Fällung angereichertes Antiserum von Tier a. (AS=Ammoniumsulfat-Fällung - siehe Methoden 2.2.11)

3.5. Trennung des ^{125}J-Myosin von niedermolekularen Reaktionsprodukten (Abb. 17)

Das nach 2.2.13. iodierte Myosin wurde von Glycin-Konjugat und nicht umgesetzten Ester (Bolton/Hunter-Reagenz) durch eine Gelfiltration an Sephadex G-1o getrennt.
Setzt man eine Zählausbeute von 7o% voraus, wurden ca. 76% der aufgetragenen radioaktiven Menge wiedergefunden; die Restaktivität wurde vom Gel durch unspezifische Bindungsstellen adsorbiert.
Auf den Proteinanteil (siehe Abb.17: Peak 1) entfielen 51.4% der eluierten Ratioaktivität.
Die vereinigten Fraktionen 5-9 enthielten 44.2% der Radioaktivität des Proteinanteils.
Bei der Annahme, daß diese Radioaktivität proportional der eluierten Proteinmenge ist, beträgt die spezifische Aktivität des iodierten Myosins 9.12 x $1o^5$CPM/µg Protein.

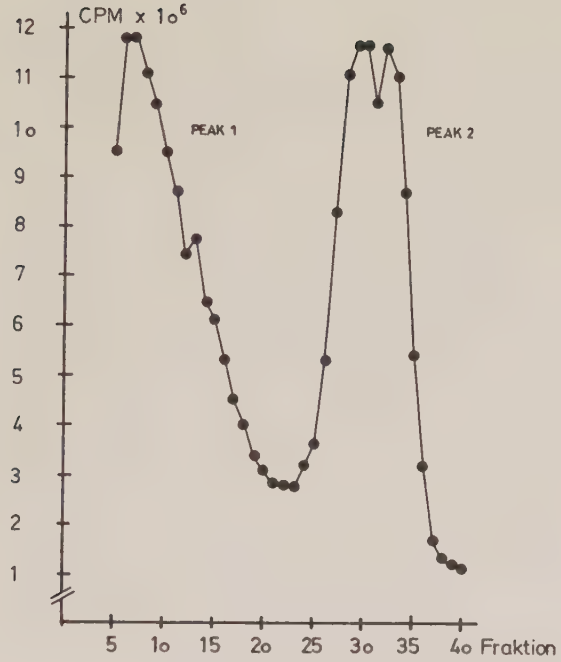


Abb. 17: Gelfiltration des ^{125}J-Myosin über Sephadex G-1o

Säule: 1.5 x 18 cm, Proteinauftrag: o.8 ml ^{125}J-Myosin mit der Proteinkonzentration 243 µg/ml, Flußrate: 1o ml/h, Fraktionsgröße: 3o Tropfen, Elution mit 2o mM NaPP-Puffer, pH 7.5o,
Peak 1 = Protein-Fraktion
Peak 2 = niedermolekulare Fraktion (Bolton/Hunter-Reagenz, bzw. Glycin-Konjugat).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt die Grundlagen zur Entwicklung eines RIA dar, der dem quantitativen Nachweis von Myosin dient, wobei der Schwerpunkt auf der Darstellung und Charakterisierung des hochgereinigten Antigens (Myosin) liegt.

a) Gewinnung von hochgereinigtem Myosin
   Aus der kritischen Überprüfung der in der Literatur bekannten Verfahren zur Extraktion und Gewinnung von hochgereinigtem Myosin und den damit gewonnenen Erfahrungen wird ein eigenes Isolierungsverfahren entwickelt.
   Die Effektivität der Reinigungsschritte wird anhand von SDS-Elektrophoresen überprüft.

In Abänderung der Verfahren verschiedener Autoren (14,16,22,37,39,41) basiert die Isolierung von Myosin in dieser Arbeit auf Salzextraktionen, Ausfällung durch Verminderung der Ionenstärke und Ultrazentrifugation.

Das zum großen Teil im Ultrazentrifugenüberstand noch vorhandene Actin kann durch eine nachfolgende Ammoniumsulfatfällung von 38% beseitigt werden.
Durch eine zweite Salzfällung von 38 - 5o% wird eine Anreicherung von Myosin erreicht.

Nach ausgiebiger Dialyse wird das "Rohmyosin" an DEAE-Sepharose CL-6B und anschließend an Hydroxylapatit chromatographiert.
Bei der Fraktionierung an DEAE-Sepharose CL-6B wird Myosin bei einer o.14 M KCl-Konzentration eluiert.
Die Spitzenfraktion weist einen UV-Quotienten von 1.49 auf und die spezifische Aktivität in dieser Fraktion beträgt 1.55 µMol P_i/min/mg Protein; es werden

ca. 87% des zur Chromatographie eingesetzten Proteins im Eluat wiedergefunden.
Die SDS-Elektrophorese zeigt neben Myosin als Hauptkomponente noch geringe Mengen an Begleitsubstanzen von α-Aktinin und C-Protein.

Die vereinigten Fraktionen 67-8o des "Myosin"-Peaks werden anschließend an Hydroxylapatit rechromatographiert und durch einen Stufengradienten von o.16 M → o.2 M → o.23 M Phosphatlösung eluiert.
Es werden drei Proteinfraktionen bei einer Wiederfindungsrate von insgesamt 76% isoliert.
Der 1. Peak (SDS-Elektrophorese) besteht hauptsächlich aus α-Aktinin und Protein im Molbereich der leichten Ketten des Myosins.
Der 2. Peak (Elution bei o.2 M Phosphatlösung) enthält nahezu ausschließlich hochgereinigtes Myosin.
Eine sehr geringe Verunreinigung befindet sich im Molbereich des C-Proteins; α-Aktinin ist nicht mehr nachzuweisen.
Der 3. Peak (Elution bei o.23 M Phosphatlösung) zeigt das gleiche elektrophoretische Bandenmuster wie der zweite Peak; nach Mozersky et al (46) handelt es sich hierbei um aggregiertes Myosin, möglicherweise beruhend auf der Bildung von Dimeren.

b) Charakterisierung des hochgereinigten Myosins
   Die Myosin-ATPase folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik, wenn als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit freigesetztes, nicht an Protein gebundenes, anorganisches Phosphat bestimmt wird.
   Die Größenordnung des ermittelten K_M-Wertes von o.2 mM stimmt mit den in der Literatur bekannten Werten überein.
   In weiteren Versuchen werden die aktivierende Wirkung von Ca^{++}-Ionen und die hemmende Wirkung von Mg^{++}-Ionen auf die ATPase-Aktivität nachgewiesen.
   Das Temperaturoptimum der Myosin-ATPase liegt bei 35°C,

ab 41°C tritt ein rascher Aktivitätsverlust ein.
Aus dem Arrhenius-Diagramm wird die Aktivierungsenthalphie $H^{\#}$ bei 25°C mit 18.4 Kcal/Mol ermittelt.

c) Immunologischer Teil
Der Nachweis der im Kaninchen gebildeten Antikörper gegen das als Immunogen eingesetzte hochgereinigte Myosin aus Skeletmuskulatur der Ratte erfolgt im Ouchterlony-Diffusionstest.
Desweiteren wird die Wirkung der Antikörper gegen Myosin im ATPase-Inhibierungstest nachgewiesen.

d) Radioaktive Markierung des Myosins
In diesem Teil der Arbeit wird Myosin nach dem Verfahren von Bolton und Hunter (35) mit ^{125}J markiert und das Protein anschließend über eine Gelfiltration an Sephadex G-1o von niedermolekularen Reaktionsprodukten befreit.
Die spezifische Aktivität des iodierten Myosins (Antigen) beträgt 9.12 x $1o^5$CPM/µg/Protein.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. R. V. Kristić: Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1978)

2. S. Ebashi, Y. Nonomura: Proteins of the myofibril. In: The structure and function of muscle; ed. G.H. Bourne. Academic Press New York and London (1973), 285-362

3. H. A. Harper, G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss: Physiologische Chemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1975)

4. A.L. Lehninger: Biochemie. Verlag Chemie - Weinheim New York (1979)

5. W.F. Harrington: Muscle proteins and muscle contraction. In: Current topics in biochemistry; ed. C.B. Anfinsen Academic Press New York and London (1972), 135-185

6. D.M. Needham: Biochemistry of muscle. In: The structure and function of muscle; ed. G.H. Bourne. Academic Press New York and London (1973), 363-415

7. J.E. Godfrey, W.F. Harrington: Self-association in the myosin system at high ionic strength. Biochemistry 9 (1970), 886-893 (I), 894-908 (II)

8. H.G. Mannherz, K.C. Holmes: Die molekulare Physiologie der Muskelkontraktion. In: Biophysik; herausgegeben von W. Hoppe u.a. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1977)

9. S. Lowey, C. Cohen: Studies on the structure of myosin. J. Mol. Biol. 4 (1962), 293-308

10. S. Lowey, H.S. Slayter, A.G. Weeds, H. Baker: Substructure of the myosin molecule. J. Mol. Biol. 42 (1969), 1-29

11. H. Tokuyama, S. Kubo, Y. Tonomura: Molecular properties of fraction S-1 from a trypsin digest of myosin. Biochem. Zeitschrift 345 (1966), 57-69

12. E. Eisenberg, C. Moos: The interaction of actin with myosin and heavy meromyosin in solution at low ionic strength. J. Biol. Chem. 242 (1967), 2945-2951

13. M. Barany, R.J. Close: The transformation of myosin in cross-innervated rat muscles. J. Physiol. 213 (1971), 455-474

14. S.V. Perry:
In: Methods in enzymology; vol. II (1955),
eds. S.P. Collowick, N.O. Kaplan.
Academic Press New York, 582-588

15. A. Szent-György: Chemistry of muscular contraction.
Academic Press Inc. New York, Publishers (1951)

16. T.C. Tsao: Fragmentation of the myosin molecule.
Biochim. Biophys. Acta 11 (1953), 368-382

17. A.L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel:
Molecular weight estimation of polypeptide chains by
electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 28 (1967), 815-82o

18. R. Starr, G. Offer: Polypeptide chains of intermediate
molecular weight in myosin preparations.
FEBS LETTERS 15 (1971), 4o-44

19. A.G. Weeds, D.R. Trentham, C.J.C. Kean, A.J. Buller:
Myosin from cross-reinnervated cat muscles.
Nature 247 (1974), 135-139

2o. H. Asai: Chromatography of myosin.
Biochemistry 2 (1963), 458-461

21. S.V. Perry: The cromatography of L-myosin on diethyl-
aminoethyl-cellulose.
Biochem. J. 74 (196o), 94-1o1

22. E.G. Richards, C.S. Chung, D.B. Menzel: Chromatography of
myosin on Diethylaminoethyl-Sephadex A-5o.
Biochemistry 6 (1967), 528-54o

23. L. Jaenicke: Einführung in die Praxis des Biochemikers.
Köln (1966)

24. E.A. Peterson: Cellulosic ion exchange.
In: Laboratory techniques in biochemistry and mole-
cular biology; eds. T.S. Work and E. Work (197o).
North-Holland Publinshing Company-Amsterdam London

25. Applikationsvorschriften der Firma Pharmacia:
1. Sephadex ion exchangers
2. DEAE-Sepharose CL-6B and CM-Sepharose CL-6B
3. Sephadex: Gel filtration in theory and practice

26. Applikationsvorschrift der Firma Bio-Rad, Katalog D (1978)

27. H. Lowry, N.J. Rosegrough, A.L. Farr, R.J. Randall:
Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193 (1951), 265-275

28. J.M. Brewer, A.J. Pesce, R.B. Ashworth: Experimentelle Methoden in der Biochemie.
Gustav Fischer-Verlag Stuttgart New York (1977)

29. T.D. Pollard, E.D. Korn: Acanthamoeba myosin.
J. Biol. Chem. 248 (1973), 4682-469o

3o. T.I. Lin, M.F. Morales: Application of a one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins.
Anal. Biochem. 77 (1977), 1o-17

31. M.A. Porzio, A.M. Pearson: Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 49o (1977), 27-34

32. Persönliche Mitteilung von Prof. U.Gröschelt-Stewart (TH. Darmstadt)

33. N.H. Axelson, J. Kroll, B. Weeke: Quantitative immuno-electrophoresis.
Universitätsforlaget Oslo-Bergen-Tromsø (1973, 162

34. Persönliche Mitteilung von Prof. G. Moser (Klin. Physiologie, Uni. Düsseldorf)

35. A.E. Bolton, W.M. Hunter: The labelling of proteins to high specific ratioactivities by conjugation to a ^{125}J-containing acylating agent.
Biochem. J. 133 (1973), 529-539

36. Applikationsvorschrift der Firma Amersham: Data sheet 112o3

37. K.M. Nauss, S. Kitagawa, J. Gergely: Pyrophosphate binding to and adenosine triphosphatase activity of myosin and its proteolytic fragments.
J. Biol. Chem. 244 (1969), 755-765

38. I.P. Trayer, S.V. Perry: The myosin of developing skeletal muscle.
Biochem. Zeitschrift 345 (1966), 87-1oo

39. I. Wikmann-Coffelt,R. Zelis, C. Fenner, D.T. Mason: Myosin chains of myocardial tissue.
I. Purification and immunological properties of myosin heavy chains.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51 (1973), 1o97-11o4

4o. M.C. Schaub, S.V. Perry: The relaxing protein system of striated muscle.
Biochem. J. 115 (1969), 993-1oo4

41. A. Weber: The ultracentrifugal separation of L-myosin and actin in a actomyosin sol under the influence of ATP. Biochim. Biophys. Acta 19 (1956), 345-351.

42. M.K. Rees, M. Young: Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. J. Biol. Chem. 242 (1967), 4449-4458

43. C.J.O.R. Morris, P. Morris: Separation methods in biochemistry. Pitmann Publishing (1976), 154-239

44. G. Bernardi, T. Kawasaki: Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxylapatite columns. Biochim. Biophys. Acta 16o, 3o1-31o

45. S.M. Mozersky, J.D. Pettinati, S.D. Kolman:Analytical chromatography of myosin on hydroxylapatite. J. Chromatography 65 (1972), 387-396

46. S.M. Mozersky, R.E. Gugger, J.D. Pettinati, S.D. Kolman: Preparative chromatography of myosin on hydroxylapatite. J. Chromatography loo (1974), 192-195

47. K. Weber, M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (1969), 44o6-4412

48. J.A. Reynolds, G. Tanford: The gross confirmation of protein-sodium-dodecyl sulfate complexes. J. Biol. Chem. 245 (197o), 5161-5167

49. A. Weber, W. Hasselbach: Die Erhöhung der Rate der ATP-Spaltung durch Myosin und Actomyosin-Gele bei Beginn der Spaltung. Biochim. Biophys. Acta 15 (1954), 237-245

5o. M. Dixon and E.C. Webb: Enzymes. Longmans (1964)

51. N. Azuma, Y. Tonumura: Kinetic studies on hydrolysis of adenosine triphosphate and inosine triphosphate by myosin A. Biochim. Biophys. Acata 73 (1963), 499-5o6

52. J. Wikmann-Coffelt, C. Fenner, A. Smith, D.T. Mason: Comparative analysis of the kinetics and subunits of myosin from canine skeletal muscle and cardiac tissue. J. Biol. Chem. 25o (1975), 1257-1262

53. J. Brahms, C.M. Kay: Molecular and enzymatic propertiesof cardiac myosin A as compared with those of skeletal myosin A.
J. Biol. Chem. 238 (1963), 198-2o7

54. M.F. Morales, K. Hotta: The adenosine triphosphatase activity of myosin B treated with S- aminoethyl-isothiuronium.
J. Biol. Chem. 235 (196o), 1979-1986

55. F.A. Sreter,J.C. Seidel, J. Gergely: Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit.
J. biol. Chem. 241 (1966), 5772-5776

56. J.J. Blum: Interactions between myosin and its substrates.
Arch. Biochem. Biophys. 87 (196o), 1o4-119

57. S. Bruggmann, E. Jenny: The immunological-specifity of myosins from cross-striated muscles as revealed by quantitative microcomplement fixation an enzyme inhibition by antisera.
Biochim. Biophys. Acta 412 (1975), 39-5o

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. Wolfgang Staib

danke ich herzlich für die Themenstellung,
die vielen Ratschläge und wertvollen Anregungen
bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso

Herrn Professor Dr. Hans Reinauer

für die Übernahme des Koreferates.

Lebenslauf

geboren:	15. Juli 1946
in:	Heinersdorf/Thr.
Eltern:	Helmut Schaefer - Isolde Schaefer geb. Taubmann
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch

Ausbildung:

1953 - 1957	Grundschule in Pressig/Ofr.
1957 - 1959	Oberrealschule in Kronach/Ofr.
1959 - 1960	Städt. Theodor Schwann-Gymnasium (Neuss)
1960 - 1967	Schloßgymnasium Benrath in Düsseldorf
1967	Reifeprüfung
1967 - 1968	Bundeswehr, W18
WS 1968/69	Biologie-Studium an der Universität zu Köln
SS 1973	Dipl.-Hauptprüfung in Biologie Hauptfach: Biochemie
1973 - 1974	Dipl.-Arbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln
1975 - 1979	Wiss. Angest. bzw. Wiss. Hilfskraft in der Physiologischen Chemie II der Universität Düsseldorf
1979 - 1981	Wiss. Hilfskraft in der Klinischen Physiologie (Düsseldorf)
WS 1975/76	Studium der Humanmedizin
April 1981 bis März 1982	Praktisches Jahr am Marien-Hospital (Düsseldorf)
28. April 1982	Bestehen der Ärztlichen Prüfung (III. Abschnitt)